

**UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS**

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**AVALIAÇÃO DO RISCO DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL
UTILIZANDO COMO BIOINDICADOR O RATINHO-CASEIRO
(*MUS MUSCULUS*)**

Ana Margarida Alonso Leitão Lopes

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

2009

**UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS**

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**AVALIAÇÃO DO RISCO DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL
UTILIZANDO COMO BIOINDICADOR O RATINHO-CASEIRO
(*MUS MUSCULUS*)**

Ana Margarida Alonso Leitão Lopes

Dissertação orientada por:

Prof^ª. Doutora Deodália Dias (DBA/FCUL)

Prof^ª. Doutora Maria da Luz Mathias (DBA/FCUL)

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

2009

"Mal deixei o ar pesado de Roma para trás e o mau cheiro do fumo das chaminés... que derramam vapor pestilento e fuligem... senti uma alteração do meu humor".

Lúcio Aneu Séneca, Filósofo Romano – 61 a.C.



ÀS PROFESSORAS DEODÁLIA DIAS E MARIA DA LUZ orientadoras deste trabalho, obrigada pelo exemplo, estímulo, dedicação, competência e amizade. Agradeço também a oportunidade de realizar este trabalho e por me terem iniciado nesta área científica, bem como os conhecimentos científicos transmitidos e meios técnicos e financeiros disponibilizados.

À DRA. CRISTINA BRANQUINHO um agradecimento muito especial pelo incentivo, apoio e disponibilidade constantes. Muito Obrigada!

A todos DA QUINTA DA APOSTIÇA, DA SECA DO BACALHAU E QUINTA DO MÉDICO que me receberam tão bem e que me permitiram fazer a amostragem deste trabalho. Obrigada pela preciosa ajuda e simpatia.

Ao meu DADDY pela indispensável ajuda no trabalho árduo das saídas de campo. Sem ti não teria sido possível, obrigada pela companhia...não foi fácil acordar tão cedo naquelas manhãs tão frias! Não me esquecerei daquele ratinho maroto que se fingiu de morto e te atraíçooou...Obrigada Daddy!!!

À ANDREIA por toda a ajuda prestada no trabalho experimental...sem ti teria sido complicado! Obrigada pelo apoio, disponibilidade e simpatia. Um muito obrigado sincero!

Ao EDUARDO, RUI, CATARINA, JOANA, BRUNO, INÊS, CARLA, SOFIA, FRANCISCO, MARIA, LUCAS, RAQUEL, TOMÁS, um obrigada muito especial pela vossa presença nesta fase da minha vida, pela amizade, apoio, carinho e incentivo. Com vocês tudo ficou mais simples e divertido. Não me esquecerei dos nossos dias de procrastinação!!! Obrigada por tudo!!!

Um obrigada especial à JOANA e a CARLA por tudo o que ensinaram no laboratório. Pelas tantas dicas que me deram quando os meus PCRs insistiam em não resultar. Obrigada pela paciência e ajuda prestada mas também pela amizade. Obrigada JO!!! Obrigada GATÃO!!!

À D. LURDES e à RUTE do Museu Nacional de História Natural, obrigada pela simpatia e apoio com que sempre me receberam. Um obrigado sincero pela preciosa ajuda laboratorial.

À SALOMÉ pela ajuda no laboratório e na luta que foi a observação dos micronúcleos...Muito obrigada pela amizade e simpatia!!!



Ao JOAQUIM E À RITA por me terem transmitido todos os ensinamentos necessários à captura e distinção dos ratinhos. Muito Obrigada!!!

Um obrigada muito especial à RITA e à SOFIA pela ajuda tão preciosa na análise estatística deste trabalho. Agradeço toda a disponibilidade e paciência.

À DRA. GRAÇA RAMALHINHO do Museu Nacional de História Natural pelos conhecimentos transmitidos, pelo incentivo, carinho e amizade com que sempre me recebeu.

À PROF. TERESA PINHEIRO pelo material de referência gentilmente cedido necessário à análise dos metais pesados.

Ao CARLOS VILELA, pela revisão dos meus textos, pelos seus preciosos conhecimentos linguísticos, pela disponibilidade constante, amizade e carinho. Muito Obrigada!!

À minha maninha, JO, simplesmente obrigada por tudo!

Ao meu DADDY E MAMMY, agradeço do fundo do coração por acreditarem em mim, pela oportunidade de realizar este mestrado, pelo incentivo e apoio incansáveis...Obrigada pelo vosso amor e por todos os valores que me transmitiram!

Ao meu RATINHO, agradeço toda a paciência, apoio e amor! Obrigada pela tua força e incentivo para que eu levasse até ao fim mais esta etapa da minha vida! Obrigada por seres a pessoa extraordinária que és! AMO-TE MUITO!!

À FILOMENA RAMOS e à INÊS VILELA, obrigada pela partilha de bons momentos, pela vossa preocupação, amizade e pelos jantares sempre apetitosos que eu tanto aprecio!! Obrigada!!

A todos os amigos e professores que me auxiliaram na realização deste trabalho e cujos nomes deixo de citar, mas que ao lerem estas palavras incorporarão estes sinceros agradecimentos.

Os metais pesados e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) são poluentes orgânicos de grande persistência ambiental encontrando-se entre os poluentes químicos mais perigosos para os ecossistemas. De uma maneira geral, estes poluentes são contaminantes da cadeia alimentar conhecidos pelos seus efeitos adversos na saúde animal e humana, nomeadamente, no aumento da incidência de alguns tipos de cancro associados a estes poluentes. Devido ao seu carácter ubiquitário, constituem uma potencial ameaça para a Saúde Pública.

O vertente estudo tem como objectivo principal avaliar o risco ambiental decorrente da contaminação por metais pesados e compostos orgânicos, recorrendo a testes de genotoxicidade efectuados a animais modelo (*Mus musculus*) colectados em locais com diferentes concentrações destes poluentes.

A concentração hepática de elementos como o níquel, cádmio, chumbo, crómio, mercúrio, cobre, zinco e manganês foi obtida para micromamíferos capturados em locais denominados como Zona Florestal, Zona Urbana e Zona Industrial, geograficamente situados na península de Setúbal e, também para outro grupo tido como Grupo de Referência e que não foram sujeitos a qualquer tipo de contaminação. Vários parâmetros morfofisiológicos, hematológicos e testes de genotoxicidade foram também avaliados afim de esclarecer os efeitos produzidos nas populações de micromamíferos.

Os animais capturados na Zona Industrial apresentaram maior biodisponibilidade de cádmio, manganês e mercúrio relativamente aos outros locais estudados. Como consequência, os animais desta zona mostraram dimensões e pesos corporais mais baixos em comparação com as outras três zonas, aumento médio do peso relativo do fígado, alterações nos parâmetros hematológicos e aumento da frequência de micronúcleos.

As respostas dos animais estudados, nas áreas mais poluídas podem indicar *stress* fisiológico e danos genéticos devido à baixa qualidade ambiental. Por último, os resultados sugerem que a biomonitorização destes contaminantes usando mamíferos silvestres é fundamental para uma avaliação rigorosa do impacto ambiental e melhorar a nossa compreensão acerca da capacidade de resposta das populações naturais aos vários tipos de poluição.

PALAVRAS-CHAVE: Ratinho-caseiro (*Mus musculus*); Metais Pesados; Parâmetros Morfofisiológicos; Genotoxicidade.

The heavy metals and the polycyclic aromatic hydrocarbons are organic pollutants of great environmental persistence found among the most dangerous chemical pollutants to the ecosystems.

In general, these pollutants are food chain contaminants known for its adverse effects on animal and human health, particularly in the increased incidence of certain cancers associated with these pollutants. Due to its ubiquity, are a potential threat to the Public Health.

This study aims to assess the main environmental risk due to contamination by heavy metals and organic compounds, using genotoxicity tests performed on animal model (*Mus musculus*) collected from sites with different concentrations of these pollutants.

The hepatic concentrations of elements such as nickel, cadmium, lead, chromium, mercury, copper, zinc and manganese was obtained for small mammals captured in locations known as Forest site, Urban site and Industrial site, geographically situated in the Setúbal peninsula, and also for another group seen as the Reference Group that were not subjected to any kind of contamination. Several morphophysiological parameters, hematology and genotoxicity tests were also evaluated in order to clarify the effects on populations of small mammals.

Specimens caught in the Industrial site had higher bioavailability of cadmium, mercury and manganese compared with other sites. As a result, the animals of this area showed small size and lower body weights compared with the other three areas, the average increase in relative liver weight, changes in haematological parameters and increased frequency of micronuclei.

The responses of the animals studied, the most polluted areas may indicate physiological stress and genetic damage due to diminished environmental quality. Finally, the results suggest that biomonitoring of contaminants using wild mammals is fundamental for an accurate environmental impact assessment and to improve our understanding of the response capacity of natural populations to pollution.

KEYWORDS: House-mouse (*Mus musculus*); Heavy Metals; Morphophysiological parameters; Genotoxicity.

AGRADECIMENTOS	-ii
RESUMO	-iv
ABSTRACT	-v
ÍNDICE DE FIGURAS	-ix
ÍNDICE DE QUADROS	-xi
LISTA DE ABREVIATURAS	-xii
1. INTRODUÇÃO	-2
1.1 Enquadramento do Estudo	-2
1.2 Poluição Ambiental: Causas e Consequências	-4
1.3 Metais Pesados e sua Toxicidade	-8
1.3.1 Metais Pesados	-8
1.3.2 Toxicidade dos Metais Pesados e Saúde Humana	-11
1.4 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e sua Toxicidade	-14
1.5 Micromamíferos como bioindicadores de poluição por Metais Pesados e Compostos Orgânicos	-17
1.5.1 O Ratinho-caseiro (<i>Mus musculus</i>) como modelo de exposição <i>in situ</i>	-19
1.6 Marcadores de Toxicidade	-19
1.6.1 Marcadores Biológicos	-19
1.6.2 Marcadores Morfológicos e Fisiológicos	-20
1.6.3 Marcadores de Genotoxicidade	-21
1.6.3.1 Polimorfismos dos genes CYP1A1 e XRCC1	-21
1.6.3.2 Testes Citológicos	-23
1.7 Objectivos	-28
1.7.1 Objectivo Geral:	-28
1.7.2 Objectivos Específicos:	-28
2. MATERIAL E MÉTODOS	-29
2.1 Área de estudo	-29
2.2 Amostragem	-30
2.3 Sacrifício dos Animais e recolha de amostras	-31

2.4 Métodos de Análise da Amostragem	-31
2.4.1 Análise Morfofisiológica	-31
2.4.2 Teste do Micronúcleos	-32
2.4.3 Teste das anomalias dos Espermatozóides	-32
2.4.4 Análise de concentração de PAHs	-33
2.4.5 Análise da concentração de metais pesados	-33
2.4.6 Determinação e Caracterização dos Polimorfismos nos genes CYP1A1 e XRCC1 em <i>Mus musculus</i>	-33
2.4.7 Tratamento de Dados	-34
3. RESULTADOS	-35
3.1 Análise Morfofisiológica	-35
3.1.1 Comprimento do Corpo	-36
3.1.2 Peso do Corpo	-36
3.1.3 Peso Relativo do Fígado	-37
3.1.4 Peso Relativo dos Rins	-38
3.1.5 Índice de Condição Física	-39
3.2 Parâmetros Hematológicos	-40
3.3 Análise da Concentração de Metais Pesados	-40
3.4 Testes de Genotoxicidade	-41
3.5.1 Análise da Frequência de Micronúcleos	-41
3.5.2 Análise das Anomalias dos Espermatozóides	-42
3.5 Correlações Estatísticas	-43
3.5.1 Metais pesados versus parâmetros Morfofisiológicos	-43
3.5.2 Metais pesados versus parâmetros Hematológicos e Genotóxicos	-46
3.6 Determinação e caracterização dos polimorfismos nos genes CYP1A1 e XRCC1 em <i>Mus musculus</i>	-48
4. DISCUSSÃO	-50
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	-59



ANEXOS

Anexo I	-xiii
Anexo II	-xvi
Anexo III	-xviii
Anexo IV	-xix
Anexo V	-xxi
Anexo VI	-xxii



Figura 1.1. Mapa representativo da Península de Setúbal (Google maps, 2009).	-3
Figura 1.2 Modelo simplificado de poluição ambiental (adaptado de Alloway e Ayres, 1993).	-6
Figura 1.3. Produção e de consumo global de determinados metais tóxicos (Nriagu, 1996).	-9
Figura 1.4. (A) Ilustração típica da estrutura molecular dos PAHs; (B) Estrutura dos 16 PAHs considerados prioritários pela Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos (ATSDR, 2009).	-16
Figura 1.5. Ratinho-caseiro (<i>Mus musculus</i>).	-17
Figura 1.6. Relações entre os factores de risco genético (polimorfismos genéticos), exposições ambientais a agentes genotóxicos, características de estilo de vida (tabagismo, consumo de álcool, micronutrientes) e indução de mutações no DNA (Iarmarcovai, 2008).	-22
Figura 1.7. A maioria das substâncias cancerígenas presentes no ambiente, agentes genotóxicos, podem sofrer bio-activação, sendo esta transformação modulada por cada perfil genético dos genes envolvidos no metabolismo (Iarmarcovai, 2008).	-23
Figura 1.8. (A) Modelo de formação de micronúcleos em eritrócitos da medula óssea por agentes clastogénicos e a relação entre aberrações cromossómicas e a frequência de micronúcleo; (B) Modelo de indução de micronúcleos por agentes clastogénicos e aneugénicos (Hayashi, 2007).	-25
Figura 1.9. (A) Gancho normal na cabeça dos espermatozóides; (B) ausência de gancho pronunciado; (C) cabeça em forma de banana; (D) cabeça disforme; (E) dobrado sobre si próprio; (F) presença de duas caudas (Wyrobek e Bruce, 1975).	-27
Figura 2.1. Localização espacial dos locais de captura dos micromamíferos (adaptado de Augusto, 2007).	-30
Figura 2.2. Biometrias gerais de um mamífero (Macdonald <i>et al.</i> , 1993).	-32
Figura 3.1. Variação de comprimento do corpo dos animais em relação ao local de captura.	-36
Figura 3.2. Variação de peso total dos animais em relação ao local de captura.	-37
Figura 3.3. Variação de peso relativo do fígado dos animais em relação ao local de captura.	-37
Figura 3.4. Variação de peso relativo do rim esquerdo e direito dos animais em relação ao local de captura.	-38
Figura 3.5. Diagrama de dispersão e modelo de regressão linear entre o peso total e o comprimento do corpo (R^2 - coeficiente de determinação).	-39

Figura 3.6. (A) Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNEPC) em 1000 eritrócitos policromáticos por local de captura; (B) Eritrócitos policromáticos micronucleados (Ampliação 100x) (seta) e célula da medula óssea.	-42
Figura 3.7. Observação microscópica de espermatozóides com cabeças e caudas separadas (ampliação 100x).	-43
Figura 3.8. Diagrama de dispersão e modelo de regressão linear entre a concentração de mercúrio e o peso total do corpo dos animais (g) (R^2 - coeficiente de determinação).	-44
Figura 3.9. Diagrama de dispersão e modelo de regressão linear entre a concentração de mercúrio e o comprimento dos animais (mm) (R^2 - coeficiente de determinação).	-45
Figura 3.10. Diagrama de dispersão e modelo de regressão linear entre a concentração de cádmio e o peso relativo do fígado (mg) (R^2 - coeficiente de determinação).	-45
Figura 3.11. Diagrama de dispersão e modelo de regressão linear entre a concentração de manganês e o peso relativo do fígado (mg) (R^2 - coeficiente de determinação).	-46
Figura 3.12. Diagrama de dispersão e modelo de regressão linear entre a concentração de manganês e a frequência de micronúcleos (R^2 - coeficiente de determinação).	-47
Figura 3.13. Diagrama de dispersão e modelo de regressão linear entre a concentração de cádmio e a frequência de micronúcleos (R^2 - coeficiente de determinação).	-48
Figura 3.14. Extração, purificação e quantificação do DNA obtido de amostras de fígado dos animais (da esquerda para a direita 11,12,13,14,15,16,17,20,21,22 e 23) em gel de agarose (diluição 30%).	-48
Figura 3.15. Amplificação por PCR dos polimorfismos <i>R399Q</i> (198pb) do gene XRCC1 e <i>MspI</i> (340pb) do gene CYP1A1 em gel de agarose.	-49

Quadro 1.1 Efeitos dos principais elementos nos diferentes órgãos e sistemas	-13
Quadro 2.1 Número de indivíduos do grupo de referência e capturados por área de estudo	-31
Quadro 3.1 Distribuição dos animais capturados por locais e sexo	-35
Quadro 3.2 Estatística descritiva para o comprimento do corpo, peso total, peso relativo do fígado, peso relativo do rim esquerdo e direito dos animais dos diferentes locais de captura	-35
Quadro 3.3 Coeficientes de condição física (K) determinados para os animais dos diferentes locais de captura	-39
Quadro 3.4 Parâmetros hematológicos dos animais (<i>Mus musculus</i>) das diferentes áreas estudadas	-40
Quadro 3.5 Médias e desvio padrão dos valores dos elementos encontrados no fígado (peso seco) dos animais dos diferentes locais de captura	-41
Quadro 3.6 Médias e desvio padrão da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNEPC) em 1000 eritrócitos policromáticos dos diferentes locais de captura	-42
Quadro 3.7 Correlações entre as concentrações de metais e os parâmetros morfofisiológicos dos animais	-44
Quadro 3.8 Correlações entre as concentrações de metais pesados e os parâmetros hematológicos e genotóxicos dos animais	-47

APA: Agência Portuguesa do Ambiente
BSA: *Bovine serum albumin*
CUF: Companhia União Fabril
CYP450: Citocromo P450
DBCP: Pesticida dibromocloropropano
EPA: Agência de Proteção Ambiental do Estados Unidos
FBS: Soro Fetal Bovino
HCT: Hematócrito
Hgb: Hemoglobina
LRA: Laboratório de Referência do Ambiente
PAHs: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
pb: Pares de base
PCDD/F: Dibenzo-p-dioxinas e dibenzofuranos policlorados
PCR: *Polimerase Chain Reaction*
PVC: Policloreto de vinila
RBC: Glóbulos vermelhos
SNP: *Single-nucleotide polymorphism*
WBC: Glóbulos brancos



1. INTRODUÇÃO

1.1 ENQUADRAMENTO DO ESTUDO

Município urbano de 1ª Ordem, integrado no distrito de Setúbal e na área metropolitana de Lisboa, o concelho do Barreiro localiza-se na margem sul do estuário do Rio Tejo, ocupando uma área aproximada de 33 km², repartida por oito freguesias (Figura 1.1).

Pode considerar-se que o desenvolvimento económico do Barreiro teve início em 1861, com a exploração das vias-férreas até Vendas Novas e Setúbal. O surgimento deste meio de transporte, despoletou um processo que viria a ser determinante, não só para o concelho, como para o país, que se materializou na implementação de indústrias pela Companhia União Fabril (CUF) a partir de 1898.

Desde então o Barreiro tornar-se-ia uma “moderna vila industrial e operária”, transformando-se por completo o antigo aspecto da vila, tanto social, económica, como urbanisticamente e tornando-se no maior centro industrial do país. Contudo, por opções económicas, nacionais e internacionais, este grande centro industrial foi praticamente desactivado nas últimas décadas.

Actualmente, é objectivo da entidade gestora do parque industrial, Quimiparque, proceder à revitalização do território, promovendo a instalação de novas actividades e, preferencialmente, de novos usos. Assim, têm vindo a ser progressivamente recuperadas áreas anteriormente destinadas à actividade industrial pesada e poluente, com a demolição de edifícios e remoção de entulhos.

Devido às anteriores actividades industriais, ocorrerem situações, de contaminação dos solos e das águas subterrâneas com produtos incompatíveis com o uso urbano. As contaminações são muito diversificadas devido aos diversos tipos de produção industrial que se realizou em cada local (Câmara Municipal do Barreiro – Quimiparque).

Para dar resposta às normas internacionais sobre contaminação, os parâmetros de qualidade a atingir variam em função dos tipos de uso previstos. Aparentemente, as zonas onde se prevêem os usos urbanos mais restritivos, em termos de normas de qualidade do solo e água, ou seja as zonas destinadas a habitação, comércio e serviços e as áreas exteriores de uso público, coincidem com aquelas onde laboraram as unidades industriais que produziram resíduos mais nocivos o que pode significar um acréscimo de dificuldade no processo de reabilitação da zona (Câmara Municipal do Barreiro – Quimiparque).

Face à situação torna-se relevante a avaliação do comportamento, interacção e efeitos dos poluentes existentes nesta área, principalmente Metais Pesados e Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs), nos organismos vivos. É neste contexto que se enquadra este trabalho, procurando fazer uma avaliação e monitorização ambiental com sustentação científica e



contribuindo assim, para a reabilitação sustentável de uma zona de grande importância paisagística e sócio- económica da margem sul do Tejo.

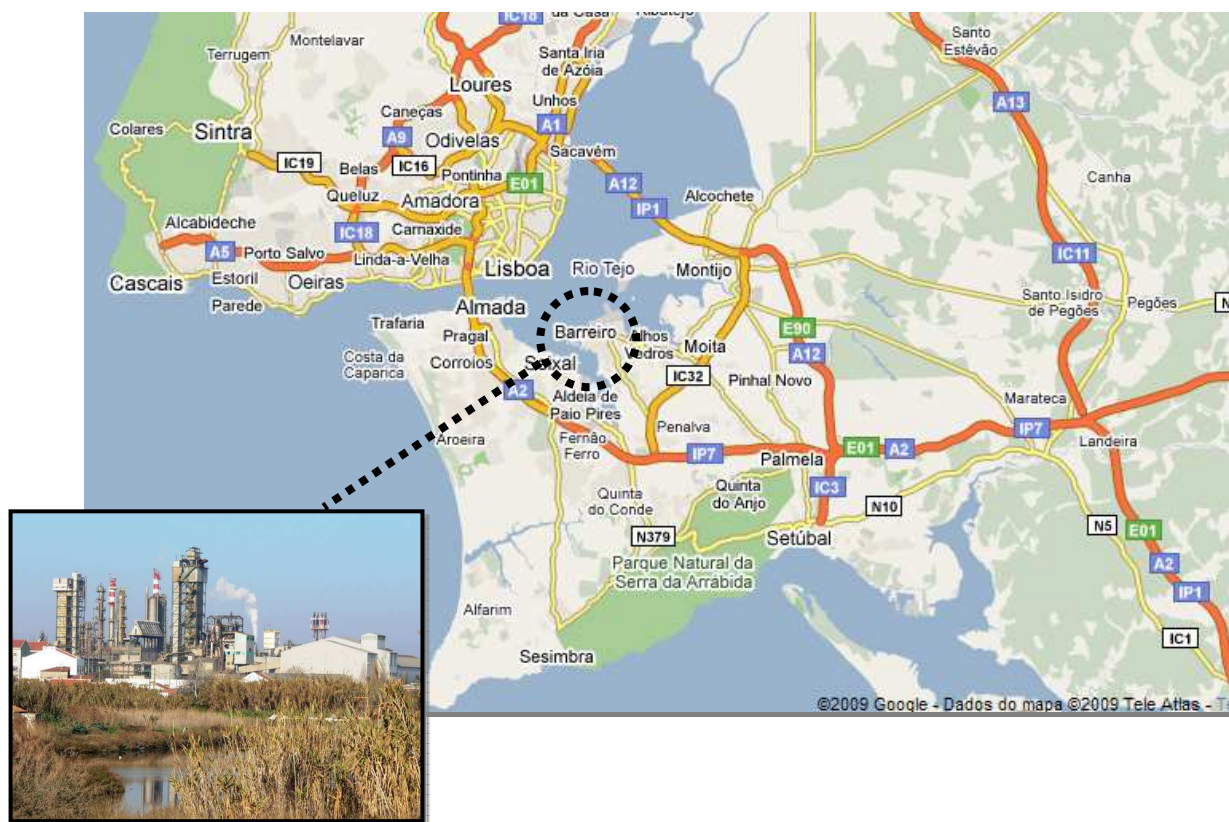


Figura 1.1. Mapa representativo da Península de Setúbal (Google maps, 2009).



1.2 POLUIÇÃO AMBIENTAL: CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS

Os impactos no meio ambiente, provocados pelo aumento da produção e do consumo de bens e serviços têm vindo a crescer de forma significativa nas últimas décadas, já que, a maioria dos problemas ambientais resulta, a montante, das pressões das diversas actividades económicas. Os exemplos mais expressivos desta realidade, residem no elevado grau de poluição atmosférica provocada pelo sector dos transportes, da indústria e da produção de energia; na degradação da qualidade da água potável, causada pela agricultura e pela indústria; nos resíduos produzidos pela indústria e pela população em geral; e também, na sobre-exploração de recursos provocada pelas actividades económicas em geral (APA - Relatório do Estado do Ambiente, 2007).

Em Portugal, os problemas da qualidade do ar não afectam o território de uma forma sistemática e homogénea mas pelo contrário, encontram-se localizados em algumas áreas onde se regista uma maior concentração urbana e a presença de grandes unidades industriais (Sines, Setúbal, Barreiro-Seixal, Lisboa, Estarreja e Porto) (APA - Relatório do Estado do Ambiente, 2007).

É notório pelo cidadão comum a relevância e acuidade com que o ambiente é alvo da atenção dos decisores e dos meios de comunicação social. De tal forma assim é que, de acordo com o inquérito “Os Portugueses e os Novos Riscos”, editado em Novembro de 2007, pelo ICS – Instituto de Ciências Sociais da Universidade de Lisboa, quando questionados sobre os riscos que mais os preocupam, 21% dos portugueses referem os riscos ambientes, sendo esta a 2ª categoria com maior percentagem de escolha, apenas precedida pela violência. Cientes da diferença entre a percepção do risco e do risco real, este valor é, contudo, indicativo da importância da problemática do ambiente nos receios da população. É de salientar que o estudo identifica ainda que, especificando qual o risco ambiental que mais temem, o mais referido foi a poluição (53% dos inquiridos) (APA - Relatório do Estado do Ambiente, 2007).

O aumento elevado na consciência pública e a preocupação com o estado do ambiente global e local, que tem ocorrido nas últimas décadas tem sido acompanhado e em parte motivado por um crescente conjunto de evidências dos valores que a poluição tem provocado na degradação ambiental. Tem sido demonstrado, *a fortiori*, que a introdução de substâncias nocivas no meio ambiente conduz a numerosos efeitos adversos na saúde humana, na produtividade da agricultura e nos ecossistemas naturais.

Apesar dos evidentes problemas como a destruição do meio ambiente, a erosão do solo e a extinção de espécies serem de extrema importância para o futuro da humanidade, é a poluição que desperta o maior e mais premente interesse. Isso ocorre porque a população em geral percebe que os impactos da poluição incidem sobre esta directamente através de efeitos na sua saúde, fonte de alimento, na degradação de edifícios, e outros elementos do património cultural, bem como com efeitos evidentes sobre as florestas, rios, zonas costeiras e outros ecossistemas. Os custos destes



efeitos na depreciação dos recursos, perda de produtividade e na limpeza ou melhoria de ambientes poluídos são altos e ocupam cada vez mais a atenção dos governos e políticos em todo o mundo, especialmente nos países desenvolvidos (Alloway e Ayres, 1993).

Entre um leque variado de definições de poluição, cita-se uma que é amplamente utilizada: a “introdução de substâncias ou energia pelo homem no meio ambiente, que possam causar riscos à saúde humana, afectar os recursos vivos e os sistemas ecológicos, danificar estruturas ou interferir com o funcionamento do meio ambiente” (Holdgate, 1975). Todavia, alguns especialistas fazem distinção entre o conceito contaminação, ou seja, situações em que a substância se encontra presente no ambiente mas não é prejudicial, e o conceito de poluição, reservado para casos em que os efeitos nocivos são aparentes. Não obstante, é difícil estabelecer um limite mínimo de toxicidade (Alloway e Ayres, 1993).

Qualquer evento de poluição apresenta quatro elementos em comum: i) uma fonte de poluentes, ii) os poluentes, iii) o meio de transporte (ar, água ou solo) e iv) o alvo (ou receptor), que inclui os ecossistemas, organismos individuais (Homem) e estruturas. A poluição pode, assim, ser classificada em diversas formas de acordo com a sua fonte (exemplo: poluição agrícola), os meios que afecta (exemplo: poluição do ar ou poluição da água) ou pela natureza do poluente (poluição por metais pesados) (Figura 1.2).

Quanto aos agentes de poluição, normalmente designados por poluentes, apresentam propriedades intrínsecas que determinam o efeito provável que vão ter após a sua emissão ou descarga para o meio ambiente. Holdgate (1979) dividiu as suas propriedades em efeito de geração, como a toxicidade em organismos vivos ou corrosão de metais, e em via de determinação, que determina a distância e a taxa de dispersão do poluente no ambiente. Estas propriedades incluem: toxicidade a curto e a longo prazo, persistência, propriedades de dispersão, reacções químicas, incluindo a sua decomposição, tendência de bioacumulação nas cadeias alimentares e processo de controlo (Alloway e Ayres, 1993).



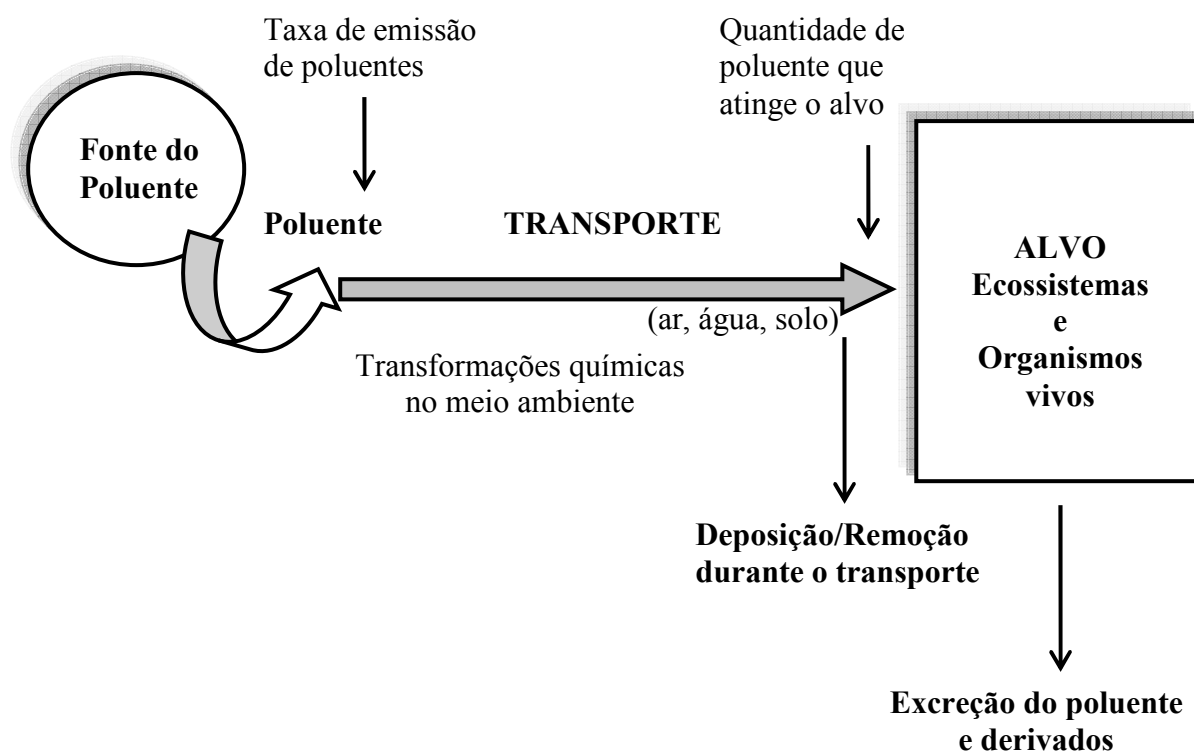


Figura 1.2 Modelo simplificado de poluição ambiental (adaptado de Alloway e Ayres, 1993).

O estudo dos efeitos tóxicos causados por poluentes naturais ou sintéticos, sobre quaisquer constituintes dos ecossistemas: animais, plantas ou microorganismos, num contexto integral – Ecotoxicologia, podem reflectir-se a vários níveis, desde o molecular ao organismal (Viegas-Crespo e Reis, 1999), podendo ser estudados pela análise de respostas fisiológicas, bioquímicas, genéticas, morfológicas e comportamentais (Alloway e Ayres, 1993).

A Revolução Industrial e suas consequências em domínios como a energia, transportes, agricultura, alimentação e saúde, levou a sintetizar, produzir e introduzir no meio ambiente, milhões de substâncias químicas que podem actuar como: poluentes tóxicos persistentes contaminando o ar, solo, água e alimentos e agentes mutagénicos, promotores ou co-cancerígenos, contribuindo para a actual crescente incidência de cancro (Irigaray, 2007), decréscimo na fertilidade masculina em países desenvolvidos (Phillips, 2008) e aparecimento de diversas doenças respiratórias e cardiovasculares (Yang, 2009).

Na área da saúde humana, as consequências da exposição a substâncias genotóxicas têm sido pesquisadas de forma intensiva durante décadas (Anderson, 1994). Este aspecto levou a que a monitorização e a avaliação de todos os poluentes que induzem toxicidade genética, incluindo metais pesados e compostos orgânicos, tenha ganho uma enorme importância, ao ponto de se



desenvolver uma nova disciplina – a Genotoxicologia, – cujo objecto incide sobre os efeitos dos agentes com toxicidade directa nos componentes hereditários dos organismos vivos (Hayes, 1994).

Em 1994, o Environmental Health Perspectives, publicou uma edição especial intitulada Genética Molecular e Ecotoxicologia, representando o início da Ecotoxicologia hoje denominada “Ecogenotoxicologia”. Em 1994 Shugart e Theodorakis definiram Ecogenotoxicologia como “uma abordagem que aplica os princípios e técnicas de toxicologia genética para avaliar os potenciais efeitos de poluição ambiental, sob a forma de agentes genotóxicos, sobre a saúde do ecossistema”. Estes ensaios podem ser facilmente aplicados a uma diversidade de espécies colectadas do seu habitat natural (Anderson, 1994).

Os procedimentos analíticos, tradicionalmente utilizados em toxicologia são limitados no que toca à demonstração dos efeitos de tais substâncias. Para superar este facto, novas abordagens com base na monitorização de organismos-modelo são usados, actualmente, para avaliar o comportamento e os efeitos de agentes contaminantes no meio ambiente, um processo conhecido como biomonitorização (Talmage e Walton, 1991).



1.3 METAIS PESADOS E SUA TOXICIDADE

1.3.1 Metais Pesados

O termo “metais pesados” envolve uma definição ambígua, mas que tem sido intensamente utilizado na literatura científica como referência a um grupo de elementos amplamente associados à poluição, contaminação e toxicidade (Duffus, 2002).

O uso mais antigo deste termo é encontrado na literatura inglesa, de acordo com o Dicionário Inglês Oxford, no livro de química inorgânica escrito por Niels Bjerrum e publicado em Londres (Bjerrum, 1936). A definição de Bjerrum foi baseada na densidade da forma elementar de um metal, classificando como “metais pesados” os elementos que possuíam densidade acima de 7 g/cm³. Durante anos esta definição foi modificada sem consenso, assim, a utilização do termo “metais pesados” deve-se meramente à sua estigmatização, ao longo do tempo, por muitos autores em vários trabalhos científicos, que atribuíram a estes elementos riscos de toxicidade e ecotoxicidade no ambiente (Duffus, 2002).

Na generalidade, os metais são categorizados como sendo essenciais ou não-essenciais. Os elementos essenciais denominados oligoelementos (microminerais) como, manganês, ferro, zinco, cobre e selênio encontram-se fisiologicamente presentes nos organismos vivos, uma vez que são importantes em vários processos moleculares e celulares e que, portanto, são muitas vezes regulados por eficientes mecanismos homeostáticos (Hoffman *et al.*, 2001).

Alguns destes elementos são, com elevada incidência, encontrados naturalmente em alimentos, frutas, legumes e em produtos multivitamínicos disponíveis comercialmente (International Occupational Safety and Health Information Centre 1999).

Enquanto que alguns metais são essenciais para a manutenção de um normal funcionamento celular dos organismos vivos, actuando como micro-nutrientes, em quantidades muito pequenas, outros metais, como o chumbo ou o cádmio, considerados não essenciais, são potencialmente tóxicos e indutores de efeitos biológicos adversos mesmo em concentrações reduzidas (Alloway, 1993).

No entanto, mesmo os metais considerados essenciais podem também provocar efeitos biológicos negativos, quer por carências do elemento, quando são assimilados a níveis demasiados baixos, quer por sobredosagem, quando assimilados em excesso (Friberg *et al.*, 1979).

Os metais pesados convertem-se em elementos tóxicos quando não são metabolizados pelo organismo e acumulam-se nos tecidos moles, já que os seres vivos não são capazes de excretá-los de forma eficaz – bioacumulação. O percurso dos metais pesados dentro de uma cadeia alimentar apresenta uma rota crescente de acumulação nos tecidos dos organismos, revelando-se como a principal ameaça para a saúde humana a exposição ao chumbo, cádmio, mercúrio e arsénio.



Os metais pesados não podem ser destruídos e são altamente reactivos do ponto de vista químico, o que explica a dificuldade em encontrá-los em estado puro na natureza. Normalmente, apresentam-se em concentrações muito reduzidas, associados a outros elementos químicos, formando minerais em rochas (Envagelista, 2008). Estes têm sido utilizados em diversas áreas desde há milhares de anos pelas sociedades humanas e, apesar dos vários efeitos adversos para a saúde serem conhecidos há muito tempo, a exposição continua, chegando mesmo a aumentar em algumas partes do mundo, em particular em países menos desenvolvidos (Jarup, 2003).

Desde meados do século XIX a produção de metais pesados aumentou acentuadamente, com concomitantes emissões para o ambiente (Figura 1.3), conforme se constata no gráfico que se segue:

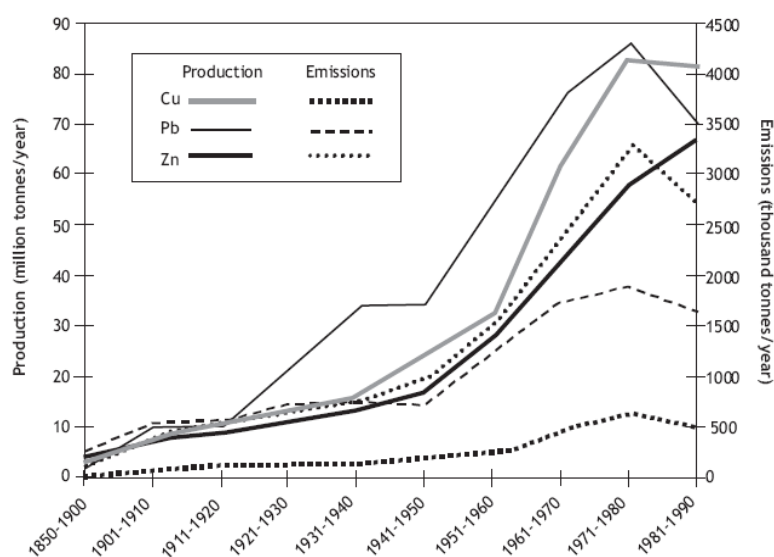


Figura 1.3. Produção e de consumo global de determinados metais tóxicos (Nriagu, 1996).

Face ao atrás exposto, no final do século XX as emissões de metais pesados começaram a diminuir em países desenvolvidos. Por exemplo, no Reino Unido as emissões caíram mais de 50%, entre 1990 e 2000 (Department of the Environment, Transport and the Regions, UK 1999).

As emissões de metais pesados para o ambiente ocorrem através de uma vasta gama de processos e percursos, incluindo o ar (ex.: durante a combustão, extracção e transformação), águas superficiais e solo (e, portanto, em águas subterrâneas e culturas). As emissões atmosféricas tendem a ser de maior preocupação em termos de saúde humana, tanto devido às quantidades envolvidas, como à ampla dispersão e potencial de exposição (Jarup, 2003).

Os metais pesados são largamente utilizados, e as suas fontes numerosas: fundições, actividades de mineração, depósitos de resíduos perigosos, fontes naturais, indústrias metalúrgicas, de tintas, de cloro e de plástico PVC (polímero de polivinila); incineradores de lixo urbano e industrial, que provocam a sua volatilização e originam cinzas ricas em metais, principalmente



mercúrio, chumbo e cádmio, assim como as indústrias de pilhas e baterias que utilizam chumbo na composição destes produtos (Envagelista, 2008).

A produção pirometalúrgica de metais não ferrosos é a principal fonte mundial de arsénio no ar, cádmio, cobre, zinco e chumbo (Nriagu e Pacyna, 1988). A indústria metalúrgica também é fonte primária de cádmio, níquel e chumbo em ecossistemas aquáticos, enquanto que para o solo as fontes de metais mais importantes em todo o mundo são produtos de minas, resíduos de fundição e precipitação atmosférica (Nriagu e Pacyna, 1988).

Como resultado, os níveis de concentração de metais, no ar, água, solo e alimentos, podem ser maiores que os níveis encontrados em áreas localizadas nas proximidades de fundições e minas.

Os depósitos de resíduos perigosos são também importantes fontes de metais pesados. Por exemplo, nos Estados Unidos, foram encontrados compostos inorgânicos em 65% dos depósitos de resíduos perigosos avaliados pela ATSDR 1992 (ATSDR, 1993).

As fontes naturais de metais são determinantes para a contaminação de águas subterrâneas. Aquíferos contaminados com arsénio têm sido relatados em vários países (ONU, 2001), destacando-se a Argentina, Chile, México, Bangladesh, Índia, China e Taiwan.

De referir ainda que em alguns países, a medicina popular, as tinturas tradicionais, a produção de cerâmica vidrada, entre outros, são fontes de metais pesados para um vasto número de indivíduos (Calderon, 2003).

Em redor de fundições e áreas de mineração, os metais encontram-se normalmente presentes como uma mistura. Por exemplo, no México, nas proximidades de fundições (Díaz-Barriga *et al.*, 1993, 1997) e áreas de mineração (Mejia *et al.*, 1999), o chumbo e arsénico apresentam-se como uma mistura no solo, ar e na poeira doméstica. Condições semelhantes foram observadas nos locais de resíduos perigosos. Nos Estados Unidos, entre as combinações mais frequentes de contaminantes no solo, a mistura de cádmio, cromo e chumbo, foi identificado em 12% dos locais avaliados pela ATSDR (1993). No que concerne às fontes naturais, tais como misturas de flúor e arsénico não são incomuns em algumas regiões do mundo (Del Razo *et al.*, 1993).

As misturas de metais pesados podem potenciar os efeitos adversos para a saúde, pois os seus componentes podem actuar sobre os órgãos individualmente, ou, em conjunto, e bloquear um mecanismo especial que o organismo usa para se defender contra as substâncias tóxicas. Assim, as misturas de metais podem interagir no organismo de forma que a toxicidade combinada é mais grave do que a toxicidade individual de cada metal isoladamente (Calderon, 2003).



1.3.2 Toxicidade dos Metais Pesados e Saúde Humana

Tendo em conta as diversas fontes ambientais de metais, vários cenários de exposição podem ser esperados. Em cada um deles, populações de alto risco podem ser identificadas. Referir-se que o conceito de risco probabilístico é definido em saúde ambiental como sendo a frequência esperada de efeitos indesejados decorrendo da exposição a um poluente. O risco de populações com diferentes características a uma mesma exposição de metal pesado pode variar. Assim, populações mais susceptíveis de serem afectadas por exposição / absorção a uma substância tóxica no ambiente são denominadas de grupo de risco.

Em relação aos metais pesados, de um modo geral, as crianças de idade pré-escolar constituem o grupo de maior risco pelas seguintes razões: contacto oral excessivo com objectos poluídos e solo; maior relação exposição / peso corporal do que os adultos vivendo no mesmo ambiente; menor “altura respiratória”, que permite aspiração de maiores quantidades de material particulado em suspensão e possivelmente maior absorção relativa que os adultos, devido ao metabolismo relativamente maior e também maior formação de células novas. Dentro do grupo de crianças, o risco é geralmente mais elevado naquelas que apresentam nutrição inadequada, uma vez que a absorção gastrointestinal e retenção nos tecidos moles podem ser maiores (Tavares, 1992).

No entanto, as mulheres grávidas merecem também idênticas considerações especiais, devido à susceptibilidade inerente ao feto decorrente da passagem transplacentária de metais no sangue materno (Calderon, 2003).

A exposição humana a metais pesados foi relatada em crianças e mulheres que vivendo nas proximidades de fundições e áreas de mineração (Morse *et al.*, 1979; Díaz-Barriga *et al.*, 1995), e também em populações expostas à poluição das águas subterrâneas (Grimaldo *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2000). Dependendo do nível de exposição, os efeitos biológicos induzidos pelos metais podem ser antecipados na população exposta. Diferentes efeitos biológicos de metais específicos têm sido extensivamente descritos na literatura. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos relacionados com a exposição de misturas de metais. Esta observação é de relevante importância, já que a exposição humana aos metais raramente é limitada a um único elemento (Calderon, 2003).

Existem no ambiente cerca de vinte metais, ou elementos que actuam como estes, considerados tóxicos para os humanos, incluindo entre outros o Hg, Cd, Pb, As, Mn, Tl, Cr, Ni, Se, Te, Sb, Be, Co, Mo, Sn, W e V. Destes, os dez primeiros são os de maior utilização industrial e, por isso mesmo, são os mais estudados sob o ponto de vista toxicológico.

Os metais essenciais, uma vez absorvidos, apresentam poucas oportunidades de produzir efeitos tóxicos, como resultado da presença de mecanismos homeostáticos, tais como o controle da absorção intestinal e a presença de proteínas específicas de transporte. A competição entre os

elementos essenciais e tóxicos para os locais de ligação da proteína está na base da toxicidade de alguns deles.

Os efeitos tóxicos dos elementos são em parte motivados pela inibição directa dos sistemas enzimáticos, devido à alteração indirecta do equilíbrios metálicos essenciais e à consequente inibição da sua disponibilidade biológica, (Apostoli, 2002) facto que inúmeras vezes lhes conferem as propriedades de bioacumulação, biomagnificação na cadeia alimentar, persistência no ambiente e distúrbios nos processos metabólicos dos seres vivos. Os processos de bioacumulação e biomagnificação são responsáveis pela transformação de concentrações consideradas normais em concentrações tóxicas para diferentes espécies do biota e para o homem.

A toxicidade dos metais pesados encontra-se directamente relacionada com a dose, o tempo de exposição, a forma física e química do elemento e a sua via de administração / absorção.

O carácter tóxico de um elemento com uma determinada forma química e física específica depende da interacção com o organismo humano, que ocorre em três estadios: 1) entrada e absorção; 2) transporte, distribuição, acumulação, biotransformação e efeito; 3) saída do organismo. Em cada um destes estadios os elementos encontram-se em diferentes formas químicas e físicas adaptadas para interagir com as características anatómicas e propriedades fisiológicas dos órgãos ou sistemas.

A absorção, tanto qualitativa quanto quantitativamente, difere no tracto gastrointestinal (exposição através de bebidas ou alimentos), nos pulmões (exposição a ar contaminado) e na pele (exposição por contacto externo). Por exemplo: a absorção por chumbo no tracto gastrointestinal é aproximadamente de 15 a 20% nos adultos e até 50% nas crianças.

Após a absorção, os elementos geralmente são transportados pelo fluxo sanguíneo e passam para os fluidos celulares, onde exercem o seu efeito tóxico.

Os metais formam uma grande variedade de compostos de coordenação (catiões metálicos de ligação orgânica), cuja estabilidade é determinada pela constante de equilíbrio específico. A forte tendência de formar compostos garante que os metais *in vivo* são, invariavelmente, complexados com determinados grupos biológicos, como sulfidrílico (-SH), amínico (-NH₂), oxidrílico (-OH), disulfúrico (-SS), carboxílico (-COOH).

A ligação do metal com qualquer um dos componentes do sistema pode afectar toda a função. Os resultados dessas interacções são alterações bioquímicas a nível subcelular e, posteriormente, a apresentação de sintomas clínicos, localizados ou sistémicos.

O Hg, Pb e Cd estão entre os metais que reagem com o grupo tiol enzimático. Noventa e cinco por cento do chumbo no organismo humano é transportado ligado à hemoglobina presente nos glóbulos vermelhos. Estudos realizados em algumas populações indicam que até 90% da carga total absorvida nos adultos deposita-se nos ossos. O chumbo atravessa a barreira sanguínea cerebral,



mais nas crianças do que nos adultos, fazendo com que o sistema nervoso seja o órgão crítico dos humanos, principalmente das crianças, causando ataxia, convulsões e coma. Estudos indicam que cerca de 50% da carga corporal de cádmio se deposita nos rins, 15% no fígado e 20% nos músculos. O rim é considerado um órgão crítico e como tal, a intoxicação por cádmio leva primordialmente à lesão renal.

O último estadio de interação do metal com o organismo é a excreção. Esta ocorre principalmente na urina e na material fecal. Um percentual de até 75% do chumbo no organismo é eliminado pela urina, cerca de 16% pelas fezes e 8% através do cabelo, unhas e outros, segundo estudos realizados em determinadas populações. Em situações específicas estudadas, a meia-vida do chumbo no sangue foi de 19 dias, nos tecidos moles e ossos trabeculares foi de 21 a 30 dias e nos ossos corticais foi de 20 anos. No caso do cádmio, apenas 0,01 a 0,02% da carga corporal (metabolizada) é eliminada diariamente, o que resulta num acúmulo ao longo do tempo. A meia-vida biológica do cádmio no fígado e no rim é de cerca de 10 anos (Tavares, 1992).

O conhecimento dos mecanismos de acção dos metais pesados é relevante não só para identificar os possíveis alvos e respectivos biomarcadores de efeitos, mas também para melhorar a determinação de elementos, por exemplo, na escolha do meio biológico mais apropriado. Os efeitos induzidos pelos metais são variados, desde efeitos tóxicos sistémicos irritantes e agudos ou crónicos a efeitos teratogénicos, mutagénicos e cancerígenos. Estes envolvem vários órgãos e aparelhos, como mostra o Quadro 1.1 (Apostoli, 2002).

Quadro 1.1

Efeitos dos principais elementos nos diferentes órgãos e sistemas

	Sistema Nervoso	Sistema Cardiovascular	Sistema Gastrointestinal	Sistema Endócrino	Sistema Imunitário	Rim	Fígado	Pulmão	Sangue	Pele
Al	+							+		
As	+		+	+			+	+	+	+
Be								+		+
Bi						+	+			+
Cd	+	+	+			+		+		
Cr			+		+	+		+		+
Co	+	+	+	+	+			+		+
Fe	+		+				+	+		
Mn	+			+	+			+		
Hg	+		+			+		+		
Ni					+			+		+
Pb	+	+	+	+	+	+			+	+
Pt					+			+		
Cu	+		+						+	
Se			+			+				+
Sn	+		+							
Tl	+		+	+		+		+		
Zn			+						+	

Al, Alumínio; As, Arsénio; Be, Berílio; Bi, Bismuto; Cd, Cádmio; Cr, Crómio; Co, Cobalto; Fe, ferro; Mn, Manganês; Hg, Mercúrio; Ni, Níquel; Pb, Chumbo; Pt, Platina; Cu, Cobre; Se, Selénio; Sn, Estanho; Tl, Tálío; Zn, Zinco.



1.4 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS E SUA TOXICIDADE

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs) são poluentes pertencentes a uma classe de compostos orgânicos caracterizados por dois ou mais anéis aromáticos fundidos e constituídos unicamente por átomos de carbono e hidrogénio (WHO, 2003) (Figura 1.4).

Estas substâncias são frequentemente emitidas para a atmosfera por actividades naturais (ex.: vulcões) e antropogénicas (resultantes da actividade humana), (ex.: em produtos da combustão incompleta de matéria orgânica em incineradores, na combustão de derivados de petróleo, em chaminés de indústrias, em processos petrolíferos e em queimadas) (Ribeiro, 2002; Gioda, 2003). A composição e a complexidade das misturas geradas dependem da fonte emissora, pois estão relacionadas com as condições de reacção, temperatura e quantidade de ar envolvido (Samanta *et al.*, 2002; Wey *et al.*, 2006).

Uma fonte relevante e rica em misturas de PAHs é o fumo do cigarro, constituindo uma grande preocupação de saúde pública, pois os impactos negativos envolvem tanto os fumadores activos como os passivos (Goodsel *et al.*, 2004).

Alguns dos PAHs descritos como carcinogénicos pela Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), como por exemplo o indeno[1,2,3-cd]pireno (InP), o benzo[a]pireno (B[a]P) e o antraceno, foram determinados e quantificados em plantas como *Cucumis sativus* (pepino japonês) e *Cucurbita pepo* ssp (abóbora), cultivadas em solos contaminados (Parrish *et al.*, 2006), mostrando que os PAHs podem tornar-se biodisponíveis e ser transferidos ao longo da cadeia alimentar.

A meia vida ambiental dos PAHs de maior peso molecular (constituídos por 5 ou mais anéis aromáticos) é relativamente elevada, o que indica que a sua degradação é lenta. Os PAHs com menor número de anéis aromáticos, ao serem sedimentados, tendem a interagir com o solo, o que pode contribuir para a sua degradação no decorrer do tempo (Johnsen *et al.*, 2006). São estáveis à hidrólise (WHO, 2003; Krivobok *et al.*, 2003), mas podem ser lentamente biotransformados por fungos e bactérias, gerando compostos mais mutagénicos com maior solubilidade em água (Umbuzeiro *et al.*, 2004). Normalmente a intensidade do impacto no ecossistema e o tempo de recuperação tendem a ser directamente proporcionais às quantidades destes compostos no meio ambiente.

Em virtude das suas propriedades físico-químicas e de distribuição vasta, o risco de contaminação humana por estas substâncias é significativo. Apresentam características lipofílicas podendo ser facilmente absorvidos através da pele, por ingestão ou por inalação, sendo rapidamente distribuídos pelo organismo (Braun *et al.*, 2004).



Quando transportados pelos alimentos, os PAHs atravessam a membrana intestinal e através de circulação entero-hepática atingem os hepatócitos ainda em elevada concentração. Para viabilizar a excreção corpórea, estas substâncias precisam ser biotransformadas enzimaticamente, o que pode levar à formação de produtos electrofilicos com capacidade de lesar biomoléculas, como o DNA. O processo de biotransformação também gera espécies reactivas de oxigénio, as quais também danificam o DNA. Estes mecanismos podem ter um efeito sinérgico na presença de outros poluentes ambientais, tais como os metais pesados, potencializando a sua genotoxicidade (Squadrito *et al.*, 2001; Mielzynska *et al.*, 2006).

Misturas de PAHs são mutagénicas em bactérias, como a *Salmonella tyhymurium* (Du Four *et al.*, 2005) e em células humanas (Pandey *et al.*, 2006), carcinogénicas em animais experimentais (Moorthy *et al.*, 2003) e, portanto, suspeitas de terem um papel importante na etiologia de muitas doenças humanas, entre elas, o cancro (Bigger *et al.*, 2002). Comprometimentos cardiovasculares são também vastamente associados à poluição (Clancy *et al.*, 2002; Zanobetti *et al.*, 2003; Moorthy *et al.*, 2003).

A biotransformação dos PAHs envolve uma série de enzimas que catalisam reacções de oxidação, redução e hidrólise (fase I) (ex.: citocromo P450), bem como as que catalisam reacções de conjugação (fase II) (ex.: glutathiona-S-transferase), que estão distribuídas em todos os tecidos, especialmente no fígado (Schoket *et al.*, 2001; Platt *et al.*, 2005; De Buck *et al.*, 2005; Carrilho *et al.*, 2005).

O sistema citocromo P450 (CYP450) constitui uma superfamília de proteínas heme localizadas no retículo endoplasmático e catalisam a oxidação de xenobióticos e endobióticos (Platt *et al.*, 2005).

Há vários mecanismos propostos para a activação enzimática dos PAHs. Um importante mecanismo de activação envolve a epoxidação de duplas ligações por CYP450 1A1 e 1B1.

A desintoxicação por isoformas de CYP450 é de fundamental importância para protecção de efeitos danosos dos poluentes. Paradoxalmente, com a indução enzimática há um aumento da capacidade oxidativa e geração de metabolitos electrofilicos dos PAHs, o que potencializa os seus efeitos tóxicos e os de outras substâncias bioactivas pelas enzimas mais expressas (Nebert *et al.*, 2006). Os genes estruturais e reguladores que determinam a estabilidade, a actividade e controlam a indução das enzimas são sujeitos a polimorfismos em humanos e animais (Hukkanen *et al.*, 2003). Os polimorfismos genéticos das enzimas de biotransformação conferem grande variabilidade interindividual à capacidade de activar ou inactivar o potencial genotóxico e carcionogénico de várias substâncias (Schoket *et al.*, 2001).



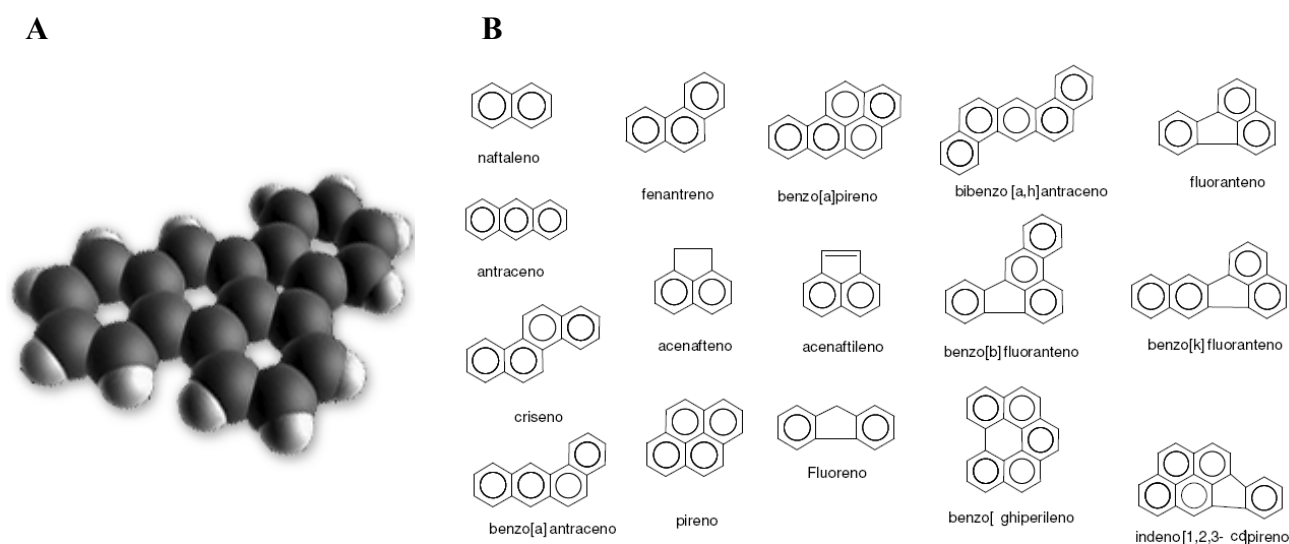


Figura 1.4. (A) Ilustração típica da estrutura molecular dos PAHs; (B) Estrutura dos 16 PAHs considerados prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (ATSDR, 2009).

Existem poucos estudos publicados acerca dos efeitos na saúde humana da exposição oral (através da dieta) aos PAHs. Em grande parte destes estudos, a exposição dá-se através da inalação e/ou por contacto com a pele. Contudo, dão mais relevância às situações de misturas de PAHs que, frequentemente, se encontram nos espaços ocupacionais e ambientais e que, no seu conjunto, são mais cancerígenas para alguns órgãos como os pulmões, a pele e a bexiga (European Commission – Health and Consumer Protection).



1.5 MICROMAMÍFEROS COMO BIOINDICADORES DE POLUIÇÃO POR METAIS PESADOS E COMPOSTOS ORGÂNICOS



Figura 1.5. Ratinho-caseiro (*Mus musculus*).

Análises químicas do solo, ar e água podem fornecer informação acerca da concentração de compostos específicos presentes no ambiente. Porém, estas por si só são inadequadas para avaliar a disponibilidade e potencial de toxicidade dos poluentes para a vida selvagem e seres humanos. Assim, os animais que vivem em ambientes espacial e temporalmente poluídos e que acumulam nos seus tecidos poluentes, poderão ser utilizados como bioindicadores de poluição ambiental (Talmage e Walton, 1991).

De acordo com Buss *et al.*, (2003), biomonitorização pode ser definido como o uso sistemático das respostas de organismos vivos para avaliar as mudanças ocorridas no ambiente, geralmente causadas por acções antropogénicas.

Os líquens e briófitas são, provavelmente, os organismos mais utilizados em estudos de biomonitorização. Estes organismos, apesar de resultarem de linhas evolutivas bem diferentes e estarem classificados em reinos vivos distintos, apresentam um conjunto de características que os favorecem como bioindicadores (Puckett, 1998; Nimis, 1990). Contudo, várias espécies de mamíferos próximos ao homem também têm sido usadas como bioindicadores (Silva *et al.*, 2003).

Estudos vários relatam a exposição de diferentes espécies de micromamíferos a áreas poluídas e o processo de bioacumulação de metais em diferentes tecidos.



Vários argumentos ecológicos, fisiológicos e práticos apoiam a utilização de micromamíferos em biomonitorização de poluição e na avaliação dos seus efeitos (Metcheva *et al.*, 2003).

Os micromamíferos são considerados representativos de um estadio intermediário entre o baixo e alto níveis tróficos pois alimentam-se de ervas, frutas e invertebrados, e por outro lado, constituem itens importantes na dieta das aves e de mamíferos carnívoros (consumidores).

O argumento fisiológico que suporta o uso de micromamíferos como bioindicadores de exposição a poluentes ambientais encontra-se relacionado com seu pequeno tamanho corporal. Devido a uma alta taxa metabólica o seu grau de exposição pode vir a ser maior do que em grandes mamíferos, que têm uma menor taxa metabólica (Sheffield *et al.*, 2001).

Embora a absorção de alguns metais por inalação seja mais eficiente que a absorção no trato gastrointestinal, a exposição oral por ingestão de alimentos contaminados é a fonte dominante de metais para os mamíferos silvestres. No entanto, a transferência de metais do meio ambiente para os mamíferos terrestres depende de vários factores abióticos e bióticos, como o período do ano, espécies envolvidas, a sua dieta e idade (Viegas-Crespo *et al.*, 2003; Nunes *et al.*, 2001; Lopes *et al.*, 2002).

Estudos em pequenos mamíferos demonstraram que estes são capazes de acumular um vasto espectro de poluentes presentes no ecossistema (Talmage e Walton, 1991). Correlações significativas entre alguns pesticidas (McBee and Bickham, 1988), radioactividade (Cristaldi *et al.*, 1990), contaminação por metais pesados e danos genéticos em roedores que vivem livres no seu habitat, têm sido detectadas (Tull-Singleton *et al.*, 1994; Ieradi *et al.*, 1998).

Vários autores têm sugerido que os pequenos mamíferos silvestres que habitam locais poluídos são mais sensíveis do que os animais sujeitos a experiências em laboratório (Reynolds *et al.*, 2006). Os animais de laboratório encontram-se geralmente sob rigorosas condições controladas, com mínima variação de factores abióticos (temperatura, humidade e fotoperíodo) e bióticos (como sexo ou idade). Além disso, os protocolos de contaminação controlada geralmente envolvem animais uniformemente expostos a um único composto tóxico, numa concentração conhecida e constante. Inversamente, as amostras de populações naturais vivem sob numerosas (e muitas vezes não controladas) circunstâncias, tais como parasitoses ou reduzida disponibilidade de alimentos, que podem contribuir para um declínio no seu estado de saúde. Assim, a quantidade de energia disponível para as actividades essenciais e de defesa contra os efeitos tóxicos da exposição a metais é consideravelmente diminuída. Para além disso, a exposição natural aos metais, frequentemente envolve uma combinação de compostos potencialmente tóxicos que não são distribuídos constantemente no tempo e no espaço (Sánchez-Chardi, 2008).



1.5.1 O Ratinho-caseiro (*Mus musculus*) como modelo de exposição *in situ*

A distribuição mundial do *Mus musculus* (Figura 1.5) é mais ampla do que a de qualquer outro mamífero, à excepção do Homem, existindo duas sub-espécies: a forma oriental, *M. m. musculus* e a forma ocidental *M. m. domesticus* (Ramalhinho, 1999).

Ocorre em quase todo o mundo devido à associação com o Homem. Em Portugal está presente em todo o território continental e nos arquipélagos dos Açores e Madeira, ocorrendo em todos os locais onde a sua associação com o Homem lhe proporcione alimento e abrigo adequados. (Macdonald, 1993).

A sua dieta é basicamente granívora, embora possa incluir uma grande variedade de alimentos, como produtos normalmente consumidos pelo Homem. Apresenta actividade, em geral, nocturna com dois picos: após o pôr-do-sol e antes do amanhecer. É muito ágil, bom nadador e trepador. É presa habitual de muitos carnívoros, incluindo o gato doméstico e aves de rapina. Apresenta dimensões corporais reduzidas (comprimentos: cabeça - corpo 72-103mm; cauda 79-95mm; pata posterior 16-19mm), corpo alongado, orelhas e olhos desenvolvidos, focinho pontiagudo e cauda longa. A sua coloração é no geral escura, com dorso entre sépia e acinzentado escuro, flancos mais claros com uma tonalidade amarelada, cauda acastanhada, não distintamente bicolor mas mais clara inferiormente (Macdonald, 1993). Um adulto pesa aproximadamente 12-22g, pesando os machos em média 14g e as fêmeas 15g (Macdonald, 1993).

O Ratinho-caseiro tem sido utilizado com frequência como modelo em estudo de biomonitorização, visto que: i) é abundante e facilmente capturado; ii) está em contacto com o solo durante o seu ciclo de vida, sendo exposto a metais pesados, principalmente por ingestão de alimentos contaminados ou do solo, bem como através da absorção cutânea; iii) as suas populações são geralmente grandes o suficiente para apoiar a recolha de indivíduos sem um grande efeito negativo ao nível da população (National Research Council, 1991).

Segundo Ieradi et al., (1995) o *Mus musculus*, usado como bioindicador, ajuda na avaliação da contaminação local e na ocorrência de biodisponibilidade de metais pesados, enquanto os testes de mutagenicidade fornecem uma indicação dos efeitos citogenéticos em populações mais expostas.

1.6 MARCADORES DE TOXICIDADE

1.6.1 Marcadores Biológicos

Os efeitos adversos nos organismos após exposição a poluentes químicos podem ser aferidos a vários níveis, recorrendo a biomarcadores.

O desenvolvimento de biomarcadores deu origem ao crescimento da área científica designada por epidemiologia molecular, que utiliza estas medições de laboratório, em vez das manifestações da doença, para avaliar os efeitos biológicos relacionados com a exposição ambiental (Calderon, 2003).

No caso dos metais pesados, é muito frequente a utilização de biomarcadores morfológicos e bioquímicos na avaliação dos seus efeitos (Nunes *et al.*, 2001; Lopes *et al.*, 2002). Mais recentemente, têm sido também utilizados marcadores genéticos (Bueno *et al.*, 2000; Ierardi *et al.*, 1998) já que alguns desses metais, como o cádmio ou o chumbo, são agentes mutagénicos e/ou potencialmente carcinogénicos (IARC, 1980).

A análise das alterações genéticas pode ser efectuada através de técnicas moleculares que estudam sequências específicas de DNA, ou através de técnicas citogenéticas que detectam alterações na estrutura dos cromossomas (Depledge, 1994).

Estudos recentes realizados em áreas mineiras de Portugal, utilizando o ratinho-ruivo (*Mus spretus*) como bioindicador *in situ* da contaminação ambiental por metais pesados, revelaram que as minas abandonadas e não sujeitas a planos de reconversão ambiental, podem constituir sérios problemas para o ambiente e para os seres vivos, na medida em que ficou provada a acumulação hepática de vários metais pesados neste modelo biológico (Viegas-Crespo *et al.*, 2003).

Igualmente, um estudo realizado numa mina de pirite abandonada em Aljustrel (Sul de Portugal) revelou um considerável aumento na biodisponibilidade e bioacumulação de metais potencialmente tóxicos (Pb, Hg, Cd e Ni) em musaranhos (*Crocidura russula*), representando as minas em questão um risco ambiental considerável. Verificou-se também que variações na estação do ano, idade e sexo devem ser consideradas na interpretação da exposição, bioacumulação e efeitos de metais em mamíferos silvestres (Sánchez-Chardi, 2007).

1.6.2 Marcadores Morfológicos e Fisiológicos

Ao longo da última década, têm sido reconhecidas alterações morfológicas nos organismos em consequência de contaminação ambiental (Liro, 1985; Tersago *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2006; Rogival *et al.*, 2007; Sánchez-Chardi e Nadal, 2007). Apesar dos marcadores morfológicos não serem normalmente indicativos de um contaminante específico, são sensíveis o suficiente para monitorizar o impacto das actividades humanas podendo fornecer dados úteis para a identificação dos efeitos negativos sobre as populações que habitam ambientes poluídos (Sheffield *et al.*, 2001).

As medidas morfológicas como as do corpo e massas de órgãos internos são comumente usadas para avaliar o estado de saúde das populações silvestres de micromamíferos expostos a

qualquer tipo de poluição. Estudos experimentais realizados em roedores demonstraram que a exposição ao chumbo pode causar uma redução do crescimento do corpo e alteração do peso dos órgãos em relação ao peso corporal (Goyer *et al.*, 1970; Bankowska e Hine 1985). Outro estudo usando micromamíferos como indicadores que habitavam uma área poluída por metais pesados apresentavam valores de comprimento e peso corporal menos elevados comparativamente a espécies de um local de referência (Sánchez-Chardi e Nadal, 2007).

A avaliação dos parâmetros hematológicos também fornece informações importantes sobre a saúde e estado fisiológico destes animais. Vários estudos relataram alterações dos parâmetros hematológicos. Alguns destes indicam que a exposição a metais tóxicos pode provocar uma diminuição significativa na circulação de eritrócitos, hemoglobina, plaquetas e glóbulos brancos no sangue total (Topashka-Ancheva *et al.*, 2003). Por exemplo, alguns metais como o chumbo, podem afectar a produção de hemoglobina, interferindo com enzimas necessárias para a biossíntese do grupo heme, resultando na sua síntese deficiente provocando anemia.

1.6.3 Marcadores de Genotoxicidade

1.6.3.1 Polimorfismos dos genes CYP1A1 e XRCC1

O tipo mais comum de variação na sequência do DNA é o polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP, *single-nucleotide polymorphism*) presente em cerca de 1/1000 nucleotídeos no genoma humano (Bonassi, 2005).

O papel das variantes genéticas que contribuem para doenças com uma etiologia complexa, tais como o cancro é ainda pouco conhecida. Um passo essencial na compreensão da complexidade da relação genótipo-fenótipo consiste em determinar e identificar os muitos SNPs existentes num genoma e que poderão estar associados a patologias como, por exemplo, o cancro (Bonassi, 2007).

O modelo de ligação da exposição ambiental aos agentes genotóxicos, factores de estilos de vida e *background* genético para os efeitos biológicos/clínicos são descritos na Figura 1.6. A resposta individual ao stress pode variar de acordo com várias condições, como o funcionamento de um gene específico, a taxa de absorção e de metabolismo de agentes genotóxicos, reparação de DNA, morte celular (apoptose/mecrose), controlo de ciclo celular e resposta imune (Figura 1.7) (Iarmarcovai, 2008).

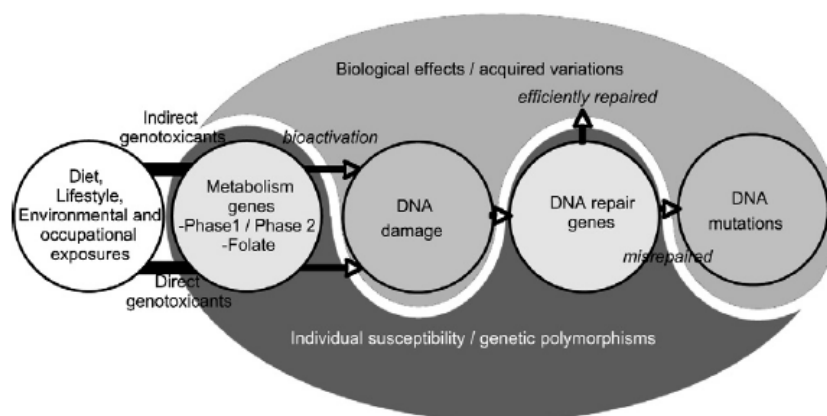


Figura 1.6. Relações entre os factores de risco genético (polimorfismos genéticos), exposições ambientais a agentes genotóxicos, características de estilo de vida (tabagismo, consumo de álcool, micronutrientes) e indução de mutações no DNA (Iarmarcovai, 2008).

Para verificar se os perfis genéticos dos animais em estudo são afectados pelos contaminantes recorreu-se à observação dos polimorfismos dos genes CYP1A1 e XRCC1 por serem genes associados ao metabolismo do citocromo P450 e reparação de DNA, já estudados anteriormente (Yu, 1999; Wang, 2001; Vakharia, 2001; Xu, 1996; Nakachi, 1993; Divine, 2000; Butkiewicz, 2001, Goode, 2002; Figueiredo, 2004). Assim, pretende-se estabelecer quais os perfis genéticos mais frequentes para este conjunto de genes nos micromamíferos da população em estudo. Por outro lado, é fundamental verificar se estes perfis podem ser associados em termos da sua frequência às áreas onde se fazem sentir os efeitos da exposição aos metais pesados e PAHs. Os polimorfismos genéticos referidos são conhecidos e encontram-se estudados em humanos (Yu, 1999; Wang, 2001; Vakharia, 2001; Xu, 1996; Nakachi, 1993; Divine, 2000; Butkiewicz, 2001, Goode, 2002; Figueiredo, 2004). Como tal, tendo o humano como referência, devido ao seu elevado grau de homologia (Waterstone *et al.*, 2002), com modelo em estudo (*Mus musculus*), pretende-se, deste modo, identificar e caracterizar os perfis genéticos encontrados nos roedores analisados neste estudo.

Nesta conformidade, no presente trabalho serão utilizados os genes CYP1A1 responsáveis pelo metabolismo do citocromo P450 e XRCC1 pela reparação do DNA, pois têm sido propostos como os mais susceptíveis de risco face à exposição aos PAHs e metais pesados (Yu, 1999; Figueiredo, 2004; Bower, 2005; Iarmarcovai, 2006; Hassanain, 2007; Mudipalli, 2007).

Vários estudos relataram variantes de baixa penetrância, polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs), como potenciais factores de susceptibilidade ao cancro, incluindo as seguintes variantes:

- Gene CYP1A1: Polimorfismo *MspI* na região não codificante 3' (T → C, posição no nucleótido 6235) (Yu,1999; Pavanello, 2000);
- Gene XRCC1: *X-Ray Repair Cross-Complementing group 1* XRCC1-R399Q (arginina → glutamina, codão 399; G → A, posição do nucleótido 28152) (Figueiredo, 2004);

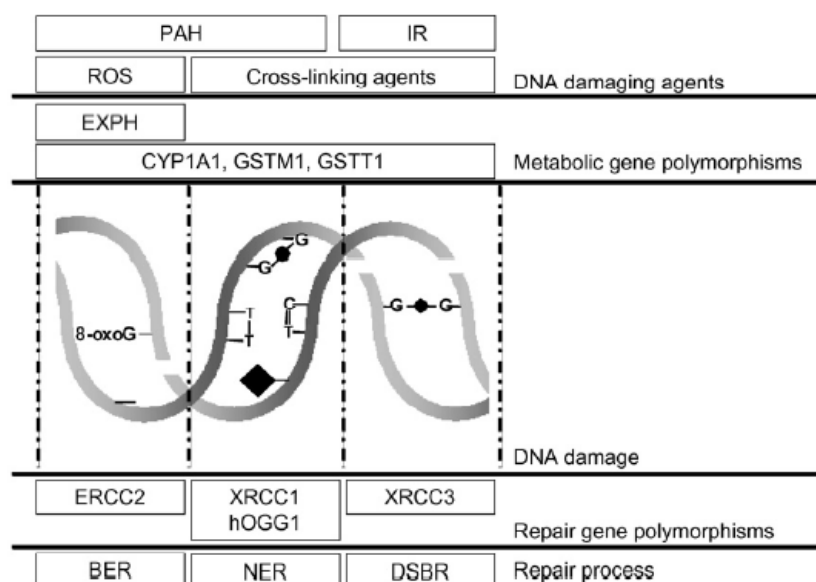


Figura 1.7. A maioria das substâncias cancerígenas presentes no ambiente, agentes genotóxicos, podem sofrer bioactivação, sendo esta transformação modulada por cada perfil genético dos genes envolvidos no metabolismo (Iarmarcovai, 2008).

1.6.3.2 Testes de Citológicos

Todos os organismos vivos estão em interação com o meio ambiente. Assim, o seu genoma fica exposto às interferências que esse meio sofre. A interação entre o meio e o organismo resulta em modificações que, quando positivas, reflectem-se na adaptação do organismo quanto à melhor exploração desse meio, o que decorre também na própria modificação do ambiente pelo organismo (Minissi e Lombi, 1997; Pascalicchio, 2002).

Os organismos vivos estão frequentemente expostos a agentes ambientais nocivos que podem induzir modificações químicas no DNA. As lesões nesta molécula podem ser induzidas por agentes químicos, provenientes do meio ambiente ou resultantes de reacções químicas que ocorrem nas próprias células, ou ainda por radiações, tais raios-X e UV. Estas modificações na estrutura do DNA são prejudiciais às células, uma vez que podem prejudicar processos vitais, como a duplicação do DNA e a transcrição génica. Estas também podem causar mutações e alterações cromossómicas, fenómenos estes que podem levar ao desenvolvimento anormal e até à morte celular. A detecção



destes produtos e seus prováveis efeitos nos organismos é importante no estudo do impacto sobre as populações animal, vegetal e humana (Costa e Menk, 2000).

Durante as últimas três décadas tem aumentado o interesse da comunidade científica em relação à detecção, conhecimento e controlo sobre os agentes ambientais responsáveis pelos danos à saúde humana e à sustentabilidade dos ecossistemas.

Testes biológicos para toxicidade e genotoxicidade são, segundo Moraes *et al.*, (2002), indispensáveis para a avaliação de reacções de organismos vivos à poluição ambiental e para indicação dos efeitos sinérgicos potenciais de vários poluentes, enquanto análises físico-químicas identificam a presença e as respectivas concentrações de diferentes poluentes.

Os micromamíferos do género *Mus* têm-se revelado bioindicadores de poluição relevantes (Cristaldi *et al.*, 1986; Gorriz *et al.*, 1996; Ieradi *et al.*, 1998). As consequências dessa exposição sobre a biologia dos animais foram avaliadas usando características citogenéticas, tais como a frequência de micronúcleos (Cristaldi *et al.*, 1986; Ieradi *et al.*, 1998; Tanzarella *et al.*, 2001) ou características morfofisiológicas, como alguns parâmetros hematológicos (Gorriz *et al.*, 1996).

Análise dos Micronúcleos

Considerado o ensaio mais amplamente usado em toxicologia genética, o teste dos micronúcleos tornou-se um dos mais importantes implementados pelas entidades reguladoras dos diferentes países para avaliar a mutagenicidade e sensibilidade dos xenobióticos (Environmental Protection Agency, 1998).

Em 1959, Evans fez a primeira contagem de micronúcleos para estimar o dano citogenético em raiz de *Vicia faba* após irradiação de neutrões e exposição a raios gama (Evans *et al.*, 1959).

Descrito por Schmid, (1975) para células da medula óssea de ratinhos, este teste baseia-se na detecção de pequenos núcleos (micronúcleos) resultante de fragmentos acêntricos decorrentes de aberrações cromossómicas ou de cromossomas inteiros, presentes no citoplasma das células que se perderam na transição da metáfase para a anáfase durante a fase de mitose.

O teste dos micronúcleos tem sido utilizado para avaliar os efeitos de compostos mutagénicos presentes no meio ambiente em diferentes organismos tanto *in vitro* como *in vivo*. Este teste é amplamente utilizado para avaliação da irreversibilidade dos impactos na toxicidade genética e para prever o risco de cancro nos humanos com um aumento da frequência dos micronúcleos (Bonassi *et al.*, 2005 e 2007). É também usado em epidemiologia molecular como biomarcador de alterações cromossómicas e de instabilidade genómica (Iarmarcovai, 2008).



Nos ensaios *in vivo* a medula óssea dos micromamíferos é rotineiramente utilizada visto que os eritrócitos policromáticos são produzidos neste tecido. Contudo, a análise de eritrócitos é também realizada em células de sangue periférico.

Na medula óssea, ao longo do processo de eritropoiese (processo de maturação de eritrócitos), quando os eritroblastos da medula óssea se desenvolvem em eritrócitos policromáticos, o seu núcleo principal é expulso da célula. Assim, fragmentos do genoma, que possam ter ficado no citoplasma sem núcleo, tornam-se visíveis, possibilitando a detecção de micronúcleos. Um aumento na frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos é indicativo de danos cromossômicos induzidos (Fenech, 2000) (Figura 1.8).

Os eritrócitos policromáticos são ainda eritrócitos imaturos caracterizados por serem células grandes, anucleadas e com ribossomas. No último passo da eritropoiese, os eritrócitos imaturos perdem os ribossomas dando origem aos eritrócitos maduros, denominados eritrócitos normocromáticos. Assim, é possível detectar micronúcleos nos eritrócitos policromáticos da medula óssea diferenciando os dois tipos de eritrócitos através de colorações específicas para os ribossomas (Hart, 1983).

Entre os vários testes de mutagenese existentes, o teste dos micronúcleos é considerado um método tecnicamente simples, rápido, confiável e sensível e que propicia a detecção de agentes clastogénicos (que quebram os cromossomas) e aneugénicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (Galindo, 2007) (Figura 1.8).

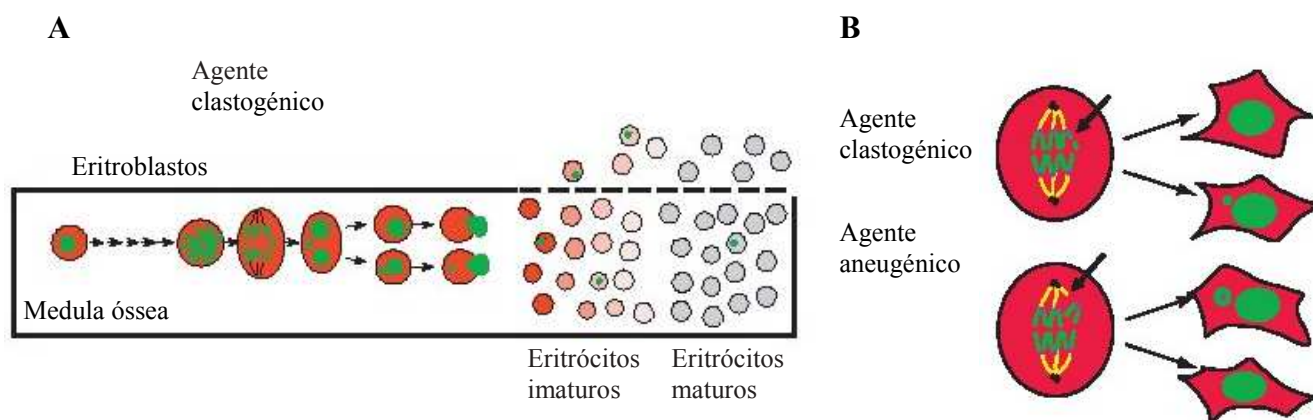


Figura 1.8. (A) Modelo de formação de micronúcleos em eritrócitos da medula óssea por agentes clastogénicos e a relação entre aberrações cromossômicas e a frequência de micronúcleo; (B) Modelo de indução de micronúcleos por agentes clastogénicos e aneugénicos (Hayashi, 2007).



Análise das Anomalias dos Espermatozóides

Ao avaliar a exposição de um organismo a agentes genotóxicos é necessário determinar não só os efeitos a nível somático como também os danos genéticos nas células germinais, dadas as implicações que isso poderá acarretar nas gerações seguintes.

A toxicologia reprodutiva masculina é um campo relativamente novo que surgiu em parte como consequência de relatórios do final dos anos 70 relatando a infertilidade dos trabalhadores do sexo masculino depois de expostos ao pesticida dibromocloropropano (DBCP) (Lahdetie, 1995). Assim, a partir do momento em que se detectou que a exposição a determinados agentes tóxicos poderia levar à diminuição da fertilidade (Legator, 1979; Whorton *et al.*, 1979), passou-se a incluir na avaliação toxicológica parâmetros como o número, a mobilidade e a morfologia dos espermatozóides. A inclusão destas medidas permitiu aumentar a sensibilidade destes testes toxicológicos e ainda obter informações sobre a acção tóxica na reprodução (Perreault e Cancel, 2001).

Apesar da rapidez de análise e da possibilidade de se obter informação sobre a transmissão dos danos genéticos, há dificuldades em estabelecer relações directas entre a exposição a tóxicos e no número de espermatozóides, uma vez que estas contagens são efectuadas por múltiplos factores. Deste modo, há uma preferência pela análise morfológica (Hedge e Sujatha, 1995).

Nos testes genotóxicos efectuados em micromamíferos recorre-se preferencialmente à avaliação de alterações morfológicas, através do teste das *Anomalias dos Espermatozóides*. Vários estudos sugerem que as mudanças induzidas na morfologia dos espermatozóides são reflexo de danos genéticos, contudo, a razão para os espermatozóides apresentarem formas anormais não é completamente clara. No entanto, existem já algumas evidências que indicam, que este tipo de anomalias é o resultado de pequenas deleções ou mutações (Wyrobek e Bruce, 1975).

A classificação das anomalias dos espermatozóides nos micromamíferos é feita com bases em alterações ao nível da cabeça e da cauda. Uma das classificações mais utilizadas divide os espermatozóides anómalos segundo: a) ausência de gancho pronunciado na cabeça dos espermatozóides; b) cabeça em forma de banana; c) cabeça disforme; d) dobrado sobre si próprio; e por fim e) espermatozóide com duas caudas (Wyrobeck e Bruce, 1975) (Figura 1.9). A brevidade de análise, a reprodutibilidade dos resultados e, sobretudo, a possibilidade de obter informação sobre a transmissão dos danos genéticos de geração em geração torna este teste indispensável na avaliação dos efeitos genotóxicos.



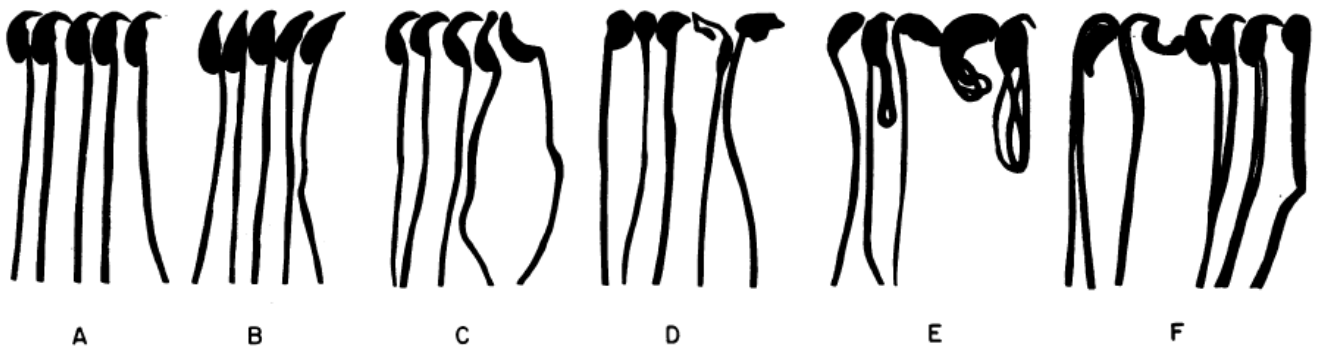


Figura 1.9. (A) Gancho normal na cabeça dos espermatozóides; (B) ausência de gancho pronunciado; (C) cabeça em forma de banana; (D) cabeça disforme; (E) dobrado sobre si próprio; (F) presença de duas caudas (Wyrobek e Bruce, 1975).

1.7 OBJECTIVOS

1.7.1 OBJECTIVO GERAL:

Com o presente estudo pretende-se utilizar ratinhos-caseiros (*Mus Musculus*) como organismos-modelo para avaliar o risco ambiental e consequências para a saúde humana da exposição a elementos potencialmente tóxicos, recorrendo a testes de genotoxicidade realizados em animais colectados de locais com diferentes concentrações de metais pesados e PAHs no distrito de Setúbal.

1.7.2 OBJECTIVOS ESPECÍFICOS:

Sucintamente, podem ser considerados como objectivos específicos deste projecto:

- Avaliar o papel dos ratinhos-caseiros (*Mus Musculus*) como indicadores de poluição ambiental, através da quantificação de concentrações de elementos em indivíduos que habitam diferentes ecossistemas influenciados pelo homem;
- Quantificar os níveis de metais pesados, Ni, Cd, Pb, Cr, Hg, Cu, Zn e Mn e PAHs presentes nos ratinhos-caseiros (*Mus Musculus*) colectados;
- Avaliar o dano genotóxico dos metais pesados através do teste dos micronúcleos e dos espermatozóides;
- Pesquisa de polimorfismos em genes de susceptibilidade a poluentes como potenciais biomarcadores de presença destes em ecossistemas. Determinar e caracterizar os polimorfismos genéticos (CYP1A1 e XRCC1,) envolvidos no metabolismo de xenobióticos e na reparação do DNA;
- Confirmar o risco para a saúde pública e ambiental da poluição causada por vários elementos, a saber, Ni, Cd, Pb, Cr, Hg, Cu, Zn e Mn.



2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDO:

Este estudo foi desenvolvido na península de Setúbal, localizada a sul de Portugal, abrangendo cerca de 150.000 ha. É uma das regiões do país mais industrializadas e densamente povoadas. Entre as indústrias existentes, destacam-se a indústria do ferro e aço, cimento, incineradoras hospitalares, energia e química. No entanto, a Península de Setúbal é também considerada uma área rica em património natural, nomeadamente floresta mediterrânea, salinas e praias (rochosas e de areal), algumas delas com dunas consideravelmente preservadas. A flora e a vegetação apresentam características atlânticas e mediterrânicas devido à sua localização geográfica (Augusto *et al.*, 2004).

No que respeita aos aspectos climáticos, devido à proximidade ao litoral atlântico e à irregularidade da linha da costa, que chega a penetrar profundamente no oceano, a região apresenta uma variação por vezes acentuada de temperatura (temperatura mínima média do mês mais frio de 2°C e temperatura máxima média do mês mais quente acima dos 32°C).

Tendo por base os níveis de contaminação por deposição atmosférica de dibenzo-p-dioxinas e dibenzofuranos policlorados (PCDD/F) e metais pesados obtidos nos estudos de biomonitorização realizados por Augusto *et al.*, (2004) foram seleccionados três locais de captura de micromamíferos (*Mus musculus*):

- Zona Industrial – Seca do Bacalhau: localidade na freguesia de Palhais, concelho do Barreiro onde, actualmente, opera uma empresa dedicada à seca do bacalhau. Segundo Augusto *et al.*, (2004) este local é classificado como zona industrial dado a proximidade com o parque industrial Quimiparque já encerrado. Em estudos prévios mostrou ser um dos locais mais contaminado em termos de deposição atmosférica para metais pesados e compostos orgânicos (PCDD/F).
- Zona Urbana – Quinta do Dr. Elvas: localizada na freguesia do Feijó, concelho de Almada, adjacente à A2 – Auto-estrada do Sul, num dos seus troços mais movimentados. Segundo Augusto *et al.*, (2004) este local é classificado como zona urbana. Em estudos prévios revelou contaminação dos solos por metais pesados.
- Zona Florestal – Quinta da Apostiça: quinta localizada na freguesia de Fernão Ferro, concelho do Seixal e inserida numa das maiores áreas florestais contíguas da península de Setúbal. Segundo Augusto *et al.*, (2004) é uma zona florestal que não apresenta contaminação relevante em comparação com as áreas anteriores. (Figura 2.1).



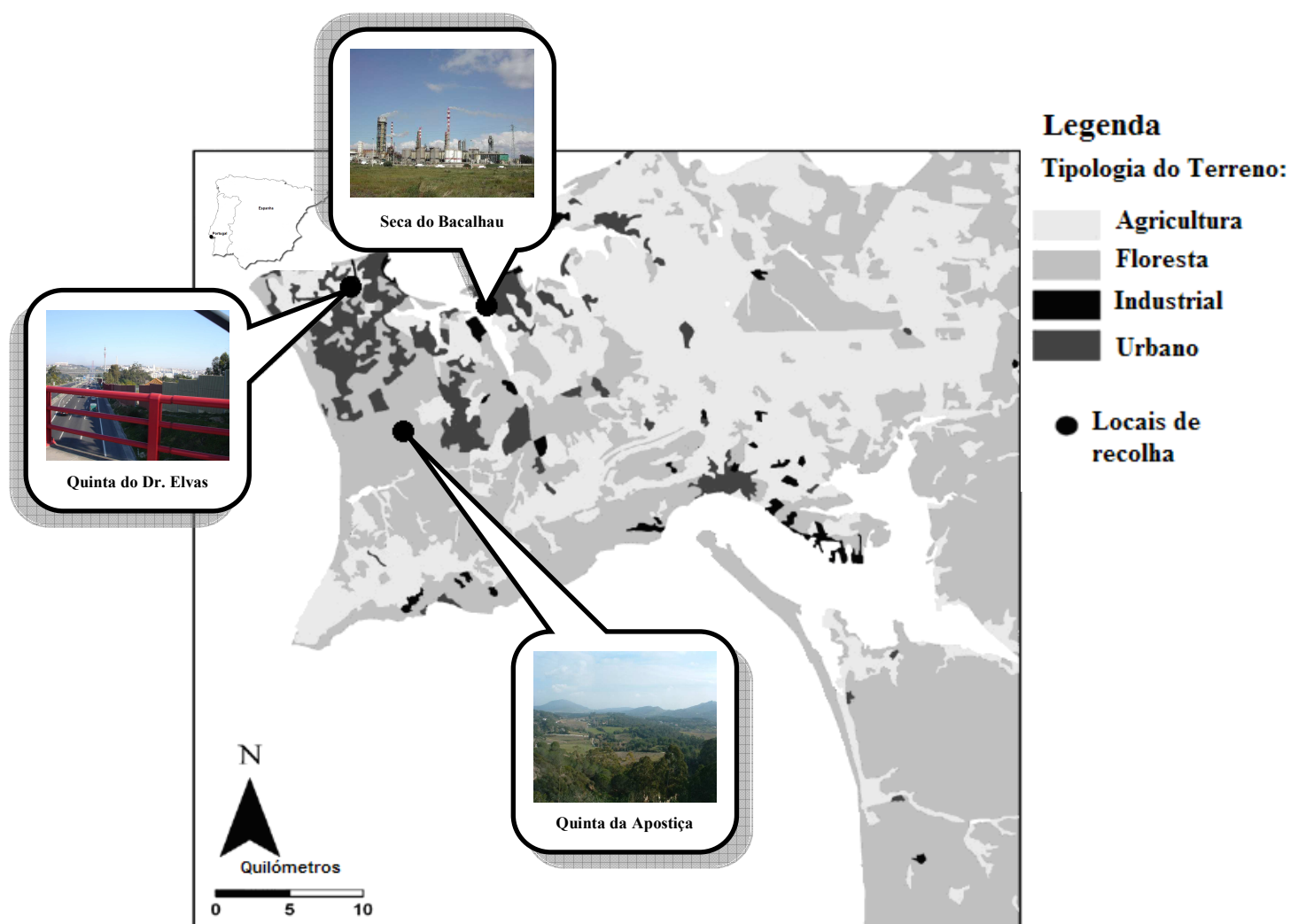


Figura 2.1. Localização espacial dos locais de captura dos micromamíferos (adaptado de Augusto, 2007).

2.2 AMOSTRAGEM:

Com base em estudos anteriores (Ieradi *et al.*, 1998) seleccionámos *Mus musculus* como bioindicador preferencial não só por ser um micromamífero relativamente frequente e abundante nos locais de estudo, por estar associado à presença humana, mas também por partilhar um elevado grau de homologia com o homem (cerca de 99% dos genes) (Waterstone *et al.*, 2002).

Durante os meses de inverno (Dezembro e Fevereiro) foram recolhidos 20 indivíduos na Zona Industrial (Seca do Bacalhau), 7 na Zona Urbana (Quinta do Dr. Elvas) e 11 na Zona Florestal (Quinta da Apostiça) utilizando 50 armadilhas Sherman (tipo “E”, LFA, 23cm x 9cm x 8cm) em cada um dos locais. Como isco, recorremos a uma pasta resultante da mistura de sardinha em lata, farinha e óleo. Foi ainda colocado algodão no interior de cada armadilha para minimizar as temperaturas mais baixas que se fazem sentir no período nocturno.



Como grupo de referência foram utilizados 6 indivíduos nascidos no laboratório da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e que nunca foram sujeitos a qualquer tipo de contaminação com os poluentes considerados neste estudo (Quadro 2.1).

Quadro 2.1

Número de indivíduos do grupo de referência e capturados por área de estudo

Local	<i>n</i>
Zona Industrial	20
Zona Urbana	7
Zona Florestal	11
Grupo de Referência	6

n, número de animais

2.3 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E RECOLHA DE AMOSTRAS:

Em laboratório, as necropsias aos micromamíferos foram realizadas no próprio dia de captura, e de acordo com os procedimentos legais relativos à protecção dos animais de laboratório (Directiva 86/609/CEE- Van Zutphen *et al.*, 2006). Os animais foram sacrificados por anestesia (éter), sendo o seu sexo determinado durante a dissecação. Ambos os fémures e testículos bem como amostras de fígado, rins e supra-renais foram colectados e conservados no frio (-20°C). Por punção cardíaca, amostras de sangue foram recolhidas de cada um dos indivíduos em seringas contendo heparina. O sangue foi imediatamente utilizado para realização do hemograma (contagem de glóbulos vermelhos, RBC ($\times 10^6 \text{ mm}^{-3}$); glóbulos brancos, WBC ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$); determinação da concentração de hemoglobina, HGB (g/dl) e hematócrito, HCT (%)) recorrendo a um Beckman Coulter. As amostras de fígado foram congeladas a -20°C para análises moleculares posteriores.

2.4 MÉTODOS DE ANÁLISE DA AMOSTRAGEM:

2.4.1 Análise Morfofisiológica

Os animais foram pesados após captura com o auxílio de uma balança de sensibilidade de 0,1mg. Os órgãos (fígado, rins e supra-renais) foram removidos, pesados e calculado o seu peso relativo ao peso corporal (Anexo I).

Também foi determinado o comprimento do corpo dos animais (distância entre a extremidade do focinho e a extremidade do corpo, com o animal distendido) com o auxílio de uma régua (Figura 2.2).



Figura 2.2. Biometrias gerais de um mamífero (Macdonald *et al.*, 1993).

2.4.2 Análise dos Micronúcleos

Para a realização do teste dos micronúcleos foi utilizado o protocolo descrito por Schmid, (1975), recorrendo aos fêmures extraídos anteriormente.

Com o auxílio de uma seringa contendo 500µl de soro fetal bovino (FBS) a medula óssea foi expelida e dissociada. A suspensão celular foi centrifugada a 800rpm durante 5 minutos e o depósito ressuspensionado em soro fetal bovino (30 µl para ambos os fêmures). Posteriormente foram preparados esfregaços a partir de uma gota espalhada numa lâmina previamente limpa. O esfregaço assim obtido foi fixado em metanol pré-análise durante 10 minutos. As lâminas foram secas ao ar e coradas com May-Grunwald Giemsa, segundo o protocolo de Cole e Cole, (1979).

As preparações codificadas foram observadas ao microscópio óptico e para cada preparação foi determinada a frequência dos micronúcleos em 1000 eritrócitos policromáticos de acordo com trabalhos recentes desta área (Tapisso *et al.*, 2009; Laffon, 2006; Topashka-Ancheva, 2003).

2.4.3 Análise das Anomalias dos Espermatozóides

Para a realização do teste das anomalias dos espermatozóides recorreu-se à recolha do epididimos dos testículos dos micromamíferos. Este fragmento foi colocado em 2ml de tampão Sorensen (pH 7,0). De seguida, o material biológico foi macerado com a ajuda de uma pipeta de Pasteur e centrifugado a 1600 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e a lavagem



repetida. Foram preparados esfregaços fixados em metanol pró-análise durante 10 minutos e deixadas a secar durante 24 horas. Por fim, foi feita a coloração com Giemsa a 10% durante 1 hora e posteriormente observadas ao microscópio óptico 2000 células por cada animal em estudo para determinação e classificação das anomalias dos espermatozóides (Acharya *et al.*, 2003). A classificação utilizada é executada com base nas alterações estruturais observadas ao nível da cabeça e respectiva cauda, segundo Wyrobeck e Bruce, (1975).

2.4.4 Análise da concentração de metais pesados

As amostras de fígado, depois de descongeladas, foram colocadas na estufa a 80°C para determinação do seu peso seco. De seguida, aproximadamente 100mg de cada amostra foi digerida em 1ml de ácido nítrico (65%) a 120°C. Tubos de ensaio com 3ml de ácido nítrico e sem as amostras foram usados como controlos. Os metais Ni, Cd, Pb e Cr foram analisados por espectrofotometria de absorção atómica (GBC 932 plus) em forno de grafite (GBC CF 3000) e os metais Hg, Cu, Zn e Mn foram analisados por espectrofotometria de absorção atómica (SpectrAA/50 Varian) usando chama de mistura ar/acetileno. Os resultados foram comparados com material de referência (*Bovine Liver SRM-1577b*) certificado pela *National Bureau of Standards*.

2.4.5 Análise de concentração de PAHs:

Foram enviadas para o Laboratório de Referência do Ambiente (LRA), pertencente à Agência Portuguesa do Ambiente, quatro amostras congeladas, contendo vários fragmentos de fígados, representativas dos três locais de captura e do grupo de referência para a análise de concentração de PAHs.

2.4.6 Determinação e Caracterização dos Polimorfismos nos genes *CYP1A1* e *XRCC1* em *Mus musculus*

O kit comercial *Tissue DNA kit (Omega bio-tek)* foi utilizado para extracção de DNA das amostras de fígado. Após a extracção, iniciou-se a optimização desta técnica às amostras em questão incluiu a variação de alguns parâmetros, nomeadamente a regulação das temperatura utilizadas, a duração dos diferentes ciclos, a concentração de magnésio ($MgCl_2$), de *bovine serum albumin* (BSA) e a quantidade de DNA na solução final.



Posteriormente, as amostras foram submetidas à técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*), utilizada para amplificar fragmentos de DNA com recurso a primers específicos que flanqueiam a região de interesse (Palumbi, 1996).

Neste estudo foram usados os seguintes *primers* referentes aos polimorfismos genéticos CYP1A1 (*MspI*) com 349 pares de base (pb) (Yu, 1999) e XRCC1 (*R399Q*) com 198pb (Figueiredo, 2004) desenhados para o humano mas que servirão de referência, devido à homologia entre a espécie em estudo (*Mus musculus*) e o humano (Waterstone *et al.*, 2002):

- CYP1A1 (F): 5' TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT 3'
CYP1A1 (R): 5' CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT 3' (Yu, 1999)
- XRCC1 (F): 5' CCAAGTACAGCCAGGTC 3'
XRCC1 (R): 5' CCGCTCCTCTCAGTAGTC 3' (Figueiredo, 2004)

2.4.7 Tratamento de Dados

Na análise estatística dos dados foi utilizado o programa *Statistica 8.3* para o Windows XP. As diferenças estatísticas entre os diferentes grupos foram avaliadas através da análise paramétrica *One-way ANOVA – Post-hoc Unequal N HSD* (Branquinho *et al.*, 2008). São consideradas diferenças significativas os valores para $P < 0,05$. As curvas de calibração (regressão linear) foram construídas no programa Excel para Windows XP.

Para o alinhamento e análise das sequências foram utilizados os programas *BioEdit* e *Sequencher 4.8*.



3. RESULTADOS

3.1 ANÁLISE MORFOFISIOLÓGICA

O número e a distribuição por sexo, dos indivíduos estudados, para cada uma das áreas seleccionadas encontram-se representados na Quadro 3.1.

Quadro 3.1

Distribuição dos animais capturados por locais e sexo

Local	Sexo	<i>n</i>	Total
Zona Industrial	M	10	20
	F	10	
Zona Urbana	M	2	7
	F	5	
Zona Florestal	M	7	11
	F	5	
Grupo de Referência	M	5	6
	F	1	

n, número de animais

A estatística descritiva para os parâmetros morfofisiológicos analisados encontra-se representada no Quadro 3.2.

Na altura da necropsia dos animais do Grupo de Referência por erro do observador não foram recolhidos os parâmetros representados no Quadro 3.2 (peso do fígado e rins) para estes animais.

Quadro 3.2

Estatística descritiva para o comprimento do corpo, peso total, peso relativo do fígado, peso relativo do rim esquerdo e direito dos animais dos diferentes locais de captura

	Grupo de Referência <i>n</i> = 6		Zona Florestal <i>n</i> = 11		Zona Urbana <i>n</i> = 7		Zona Industrial <i>n</i> = 20	
	Média ± SE	CV (%)	Média ± SE	CV (%)	Média ± SE	CV (%)	Média ± SE	CV (%)
Comprimento do corpo (mm)	87,50±2,01 ^a	5,63	83,09±1,54 ^{ac}	6,40	79,57±2,77 ^{ac}	9,84	77,20±1,30 ^{bc}	7,51
Peso do corpo (g)	17,71±0,65 ^a	9,05	15,01±0,71 ^{ac}	16,37	13,73±0,83 ^{bc}	16,96	12,70±0,53 ^{bc}	18,79
Peso relativo do Fígado (mg)	-	-	60,30±2,97	17,09	56,51±4,23	21,17	71,16±3,01	18,91
Peso relativo do Rim Esquerdo (mg)	-	-	7,77±0,42	18,59	7,80±0,32	11,55	7,10±0,20	12,81
Peso relativo do Rim Direito (mg)	-	-	8,16±0,43	18,42	8,16±0,22	7,65	7,33±0,18	10,69

n, número de animais; SE, erro standard; CV (%), coeficiente de variação

Letras diferentes significam diferenças significativas para $P < 0,05$



3.1.1 Comprimento do Corpo

Relativamente ao comprimento do corpo dos animais observou-se elevada dispersão nos valores deste parâmetro em todos os grupos, sendo a Zona Urbana o grupo com a maior taxa de variação. Na Figura 3.1 encontra-se representada a variação de comprimento do corpo dos animais em relação aos diferentes locais de captura.

Em média, os animais da Zona Industrial apresentavam dimensões corporais mais reduzidas ($77,20 \pm 1,30$ mm), sucedendo-se a Zona Urbana ($79,57 \pm 2,77$ mm), Zona Florestal ($83,09 \pm 1,54$ mm) e Grupo de Referência ($87,50 \pm 2,01$ mm).

São consideradas diferenças significativas os valores para $P < 0,05$ sendo o comprimento do corpo significativo entre o Grupo de Referência e a Zona Industrial (Quadro 3.2).

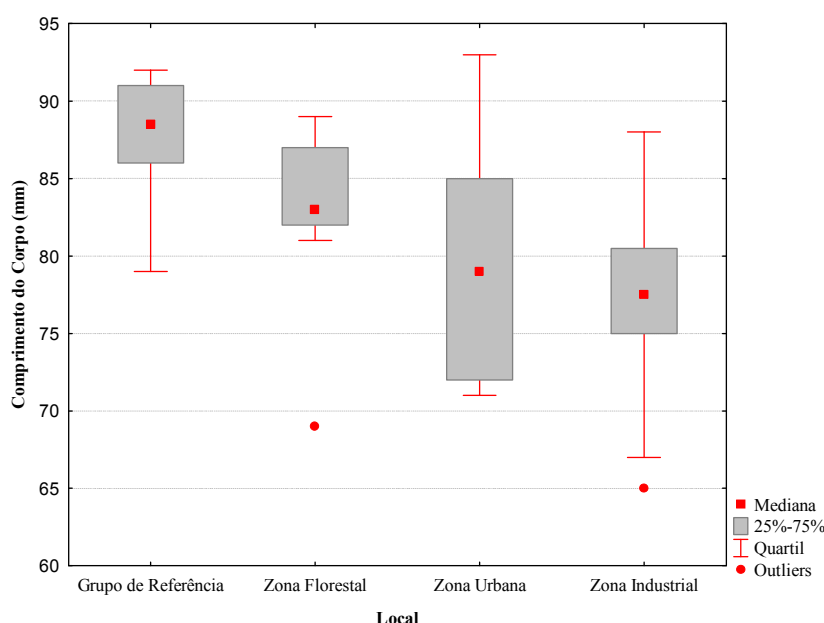


Figura 3.1. Variação de comprimento do corpo dos animais em relação ao local de captura.

3.1.2 Peso do Corpo

Relativamente ao peso total dos animais observou-se igualmente elevada dispersão nos valores deste parâmetro nos grupos da Zona Urbana e Industrial. Na Figura 3.2 encontra-se representada a variação de peso total dos animais em relação aos diferentes locais de captura.

Em média, os animais da Zona Industrial apresentavam menor peso total ($12,70 \pm 0,53$ g), sucedendo-se a Zona Urbana ($13,73 \pm 0,83$ g), Zona Florestal ($15,01 \pm 0,71$ g) e Grupo de Referência ($17,71 \pm 0,65$ g).

São consideradas diferenças significativas os valores para $P < 0,05$ sendo o peso total significativo entre o Grupo de Referência com a Zona Industrial e Zona Urbana (Quadro 3.2).



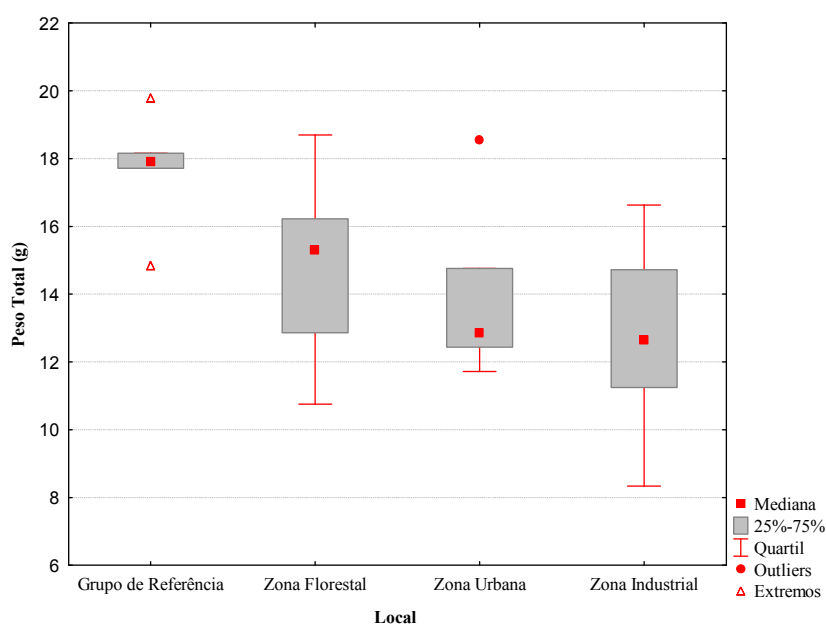


Figura 3.2. Variação de peso total dos animais em relação ao local de captura.

3.1.3 Peso Relativo do Fígado

Quanto ao peso relativo do fígado observou-se elevada dispersão nos valores deste parâmetro em todos os grupos. Na Figura 3.3 encontra-se representada a variação do peso relativo do fígado dos vários grupos em relação aos diferentes locais de captura.

Em média os animais da Zona Industrial apresentavam maior peso relativo do fígado ($71,16 \pm 3,01$ mg), sucedendo-se a Zona Florestal ($60,30 \pm 2,97$ mg) e Zona Urbana ($56,51 \pm 4,23$ mg).

Não se observaram diferenças significativas entre o peso relativo do fígado e os diferentes locais. Contudo, é possível verificar uma tendência de aumento do peso relativo do fígado com o aumento da contaminação do local (Quadro 3.2).

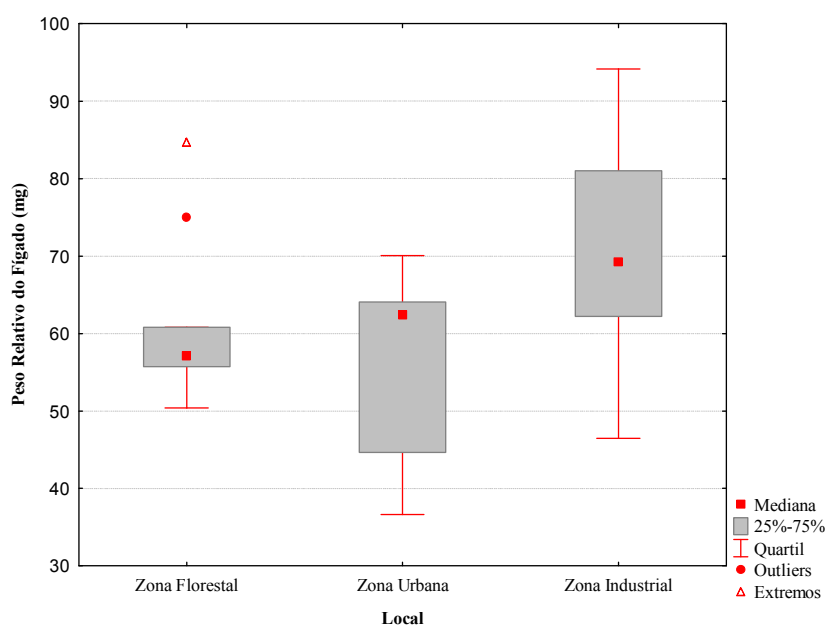


Figura 3.3. Variação de peso relativo do fígado dos animais em relação ao local de captura.



3.1.4 Peso Relativo dos Rins

Para o peso relativo dos rins dos animais foi observada uma dispersão nos valores deste parâmetro particularmente na Zona de Florestal e Zona Industrial. Na Figura 3.4 encontram-se representadas as variações dos pesos relativos dos rins esquerdo e direito dos animais em relação aos diferentes locais de captura.

Em média os animais da Zona Urbana apresentavam maior peso relativo dos rins, sucedendo-se a Zona Florestal e Zona Industrial.

Não foram observadas diferenças significativas entre os pesos relativos dos rins esquerdo e direito e os locais de captura.

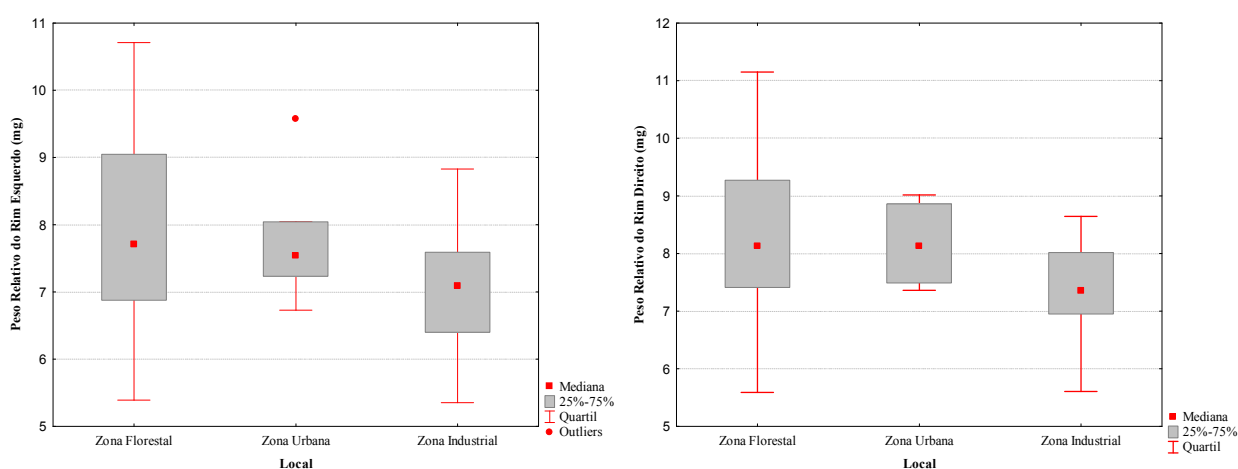


Figura 3.4. Variação de peso relativo do rim esquerdo e direito dos animais em relação ao local de captura.



3.1.5 Índice de Condição Física

Na Figura 3.5 encontra-se representado o diagrama de dispersão entre o peso total e o comprimento do corpo dos animais dos diferentes locais. Também se apresenta a linha e a equação de regressão linear entre as duas variáveis.

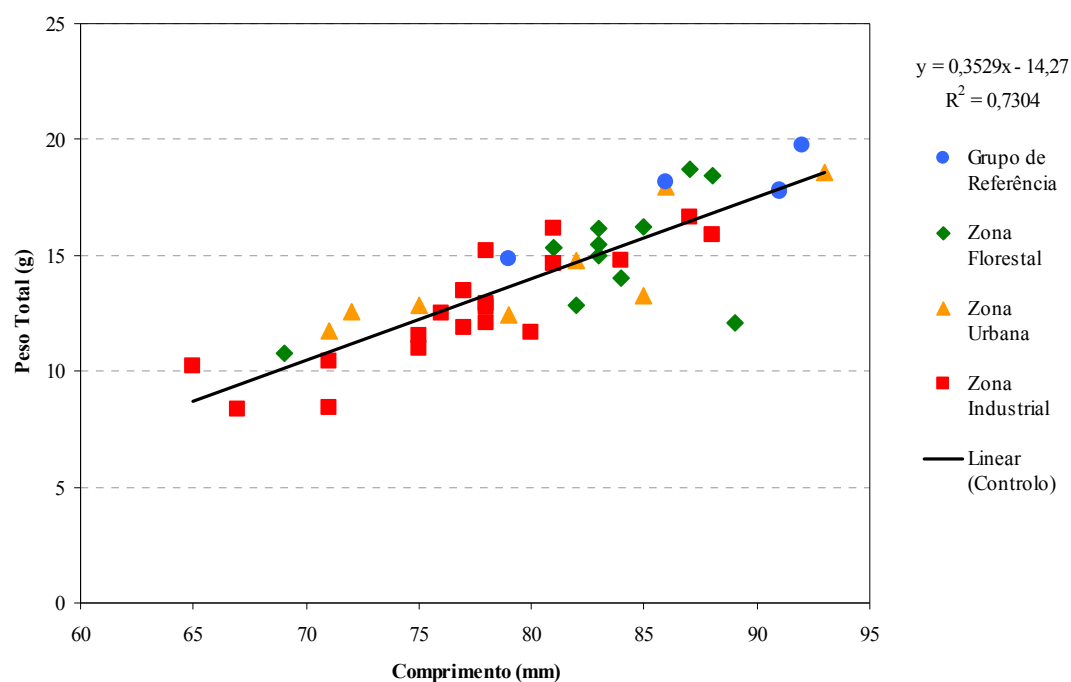


Figura 3.5. Diagrama de dispersão e modelo de regressão linear entre o peso total e o comprimento do corpo (R^2 - coeficiente de determinação).

A partir desta recta de regressão foi possível determinar o peso ideal, de acordo com o comprimento do corpo de cada animal, e calculado o coeficiente de condição física (K). Este foi definido como a razão entre o peso total observado e o esperado. Os valores de $K > 1$ revelam que os animais se encontram em boas condições físicas, enquanto que valores de $K < 1$ revelam animais em piores condições físicas, tal como é referido no Quadro 3.3.

Não se observaram diferenças significativas entre os coeficientes de condição física para os diferentes grupos de animais.

Quadro 3.3

Coefficientes de condição física (K) determinados para os animais dos diferentes locais de captura

	Grupo de Referência Média	Zona Florestal Média	Zona Urbana Média	Zona Industrial Média
K	1,07	1,01	1,00	0,97
n	6	11	7	20

n, número de animais



3.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Os parâmetros hematológicos identificados encontram-se representados no Quadro 3.4.

A contagem de glóbulos brancos revelou que os animais da Zona Industrial apresentavam maior número de células brancas ($3,6 \times 10^3 \text{ mm}^{-3}$).

A contagem dos glóbulos vermelhos revelou que os animais da Zona Florestal apresentavam maior número destas células ($8,2 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$) ao contrário da Zona Urbana que apresentava o menor número destas células ($5,2 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$).

Relativamente à concentração de hemoglobina e ao hematócrito, a Zona Florestal apresentou os valores mais elevados destes parâmetros, 12,3 (g/dl) e 40 (%) respectivamente.

São consideradas diferenças significativas os valores para $P < 0,05$ sendo significativo o valor do hematócrito entre o Zona Florestal e a Zona Urbana. O valor de hemoglobina foi igualmente significativo entre a Zona Florestal e a Zona Urbana e entre a Zona Urbana e a Zona Industrial (Quadro 3.4).

Quadro 3.4

Parâmetros hematológicos dos animais (*Mus musculus*) das diferentes áreas estudadas

Hemograma	Zona Florestal		Zona Urbana		Zona Industrial	
	$n = 11$		$n = 7$		$n = 20$	
	Mediana	Min-Max	Mediana	Min-Max	Mediana	Min-Max
WBC ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	3,2	1,0-12,7	1,9	0,2-8,5	3,6	0,7-8,8
RBC ($\times 10^6 \text{ mm}^{-3}$)	8,2	4,6-11,13	5,2	3,1-7,8	7,3	0,4-10,5
Hgb (g/dl)	12,3 ^a	6,6-16,8	4,3 ^b	4,3-10,8	10,6 ^a	6,8-14,6
HCT (%)	40 ^a	22,3-55,3	16 ^{bc}	16-37,7	35,4 ^{ac}	5,2-47,9

WBC ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$), glóbulos brancos; RBC ($\times 10^6 \text{ mm}^{-3}$), glóbulos vermelhos; Hgb (g/dl), concentração de hemoglobina; HCT (%), hematócrito

n , número de animais, Min-Max, mínimo e máximo

Letras diferentes significam diferenças significativas para $P < 0,05$.

3.3 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS PESADOS

Em média os metais encontrados em maiores concentrações na Zona Industrial foram cádmio ($131,52 \pm 125,43$), mercúrio ($6,44 \pm 2,74$) e manganês ($0,72 \pm 0,25$).

Relativamente à Zona Urbana em média os metais encontrados em concentrações mais elevadas foram níquel ($3,29 \pm 7,18$), chumbo ($83,65 \pm 44,46$), cobre ($2,13 \pm 0,54$) e Zinco ($9,71 \pm 2,91$).

Nas Zona Florestal foi encontrada a concentração média mais elevada do elemento crómio ($50,29 \pm 7,44$) (Quadro 3.5).



São consideradas diferenças significativas os valores para $P < 0,05$ sendo significativa a concentração de cádmio entre a Zona Florestal e Zona Industrial.

A concentração do elemento chumbo foi significativa entre Grupo de Referência com Zona Florestal e Zona Urbana. E Igualmente entre Zona Industrial com a Zona Urbana e Florestal.

Relativamente ao elemento cobre os valores de concentração foram significativos entre a Zona Urbana e a Zona Industrial.

Para o elemento mercúrio foram observadas diferenças significativas entre o Grupo de Referência e a Zona Industrial.

O elemento manganês revelou-se igualmente significativo entre a Zona Industrial e os restantes grupos, Grupo de Referência, Zona Florestal e Zona Urbana.

Quadro 3.5

Médias e desvio padrão dos valores dos elementos encontrados no fígado (peso seco) dos animais dos diferentes locais de captura

	Grupo de Referência	Zona Florestal	Zona Urbana	Zona Industrial
	Média \pm D.P.	Média \pm D.P.	Média \pm D.P.	Média \pm D.P.
Ni ($\mu\text{g/g}$)	0,09 \pm 0,21 $n = 6$	1,11 \pm 2,49 $n = 11$	3,29 \pm 7,18 $n = 7$	2,94 \pm 5,22 $n = 20$
Cd ($\mu\text{g/g}$)	1,27 \pm 0,79 ^a $n = 6$	6,45 \pm 12,57 ^{ab} $n = 11$	13,64 \pm 29,56 ^{ab} $n = 7$	131,52 \pm 125,43 ^{ac} $n = 18$
Pb ($\mu\text{g/g}$)	25,76 \pm 4,96 ^a $n = 6$	78,41 \pm 14,53 ^b $n = 11$	83,65 \pm 44,46 ^b $n = 7$	32,08 \pm 27,94 ^a $n = 20$
Cr ($\mu\text{g/g}$)	14,54 \pm 10,82 $n = 6$	50,29 \pm 7,44 $n = 11$	49,19 \pm 74,77 $n = 7$	31,33 \pm 23,45 $n = 20$
Hg (mg/g)	1,35 \pm 1,04 ^a $n = 6$	3,91 \pm 2,44 ^{ac} $n = 9$	4,49 \pm 3,48 ^{ac} $n = 7$	6,44 \pm 2,74 ^{bc} $n = 20$
Cu (mg/g)	1,88 \pm 0,34 ^a $n = 6$	1,74 \pm 0,46 ^a $n = 11$	2,13 \pm 0,54 ^{ab} $n = 7$	1,35 \pm 0,37 ^{ac} $n = 20$
Zn (mg/g)	8,78 \pm 2,00 $n = 6$	9,62 \pm 3,23 $n = 11$	9,71 \pm 2,91 $n = 7$	7,56 \pm 2,2 $n = 20$
Mn (mg/g)	0,38 \pm 0,13 ^a $n = 6$	0,43 \pm 0,08 ^a $n = 11$	0,43 \pm 0,22 ^a $n = 7$	0,72 \pm 0,25 ^b $n = 16$

Ni, níquel; Cd, cádmio; Pb, chumbo; Cr, crômio; Hg, mercúrio; Cu, cobre; Zn, zinco; Mn, manganês

D.P., desvio padrão; n , número de animais

Letras diferentes significam diferenças significativas para $P < 0,05$.

3.4 TESTES DE GENOTOXICIDADE

3.4.1 Análise da Frequência de Micronúcleos

A frequência mais elevada de micronúcleos foi registada no grupo da Zona Industrial (8,56 \pm 3,2), enquanto que os valores mais baixos foram observados na Zona Florestal (0,73 \pm 0,7) (Figura 3.6).

São consideradas diferenças significativas os valores para $P < 0,05$ sendo a frequência de micronúcleos significativa entre a Zona Florestal e Zona Industrial. E igualmente entre a Zona Urbana e a Zona Industrial (Quadro 3.6).

Devido à escassez do reagente, soro fetal bovino, durante a necropsia dos animais, não foi possível a realização da análise dos micronúcleos para quatro animais da Zona Industrial (Anexo I).

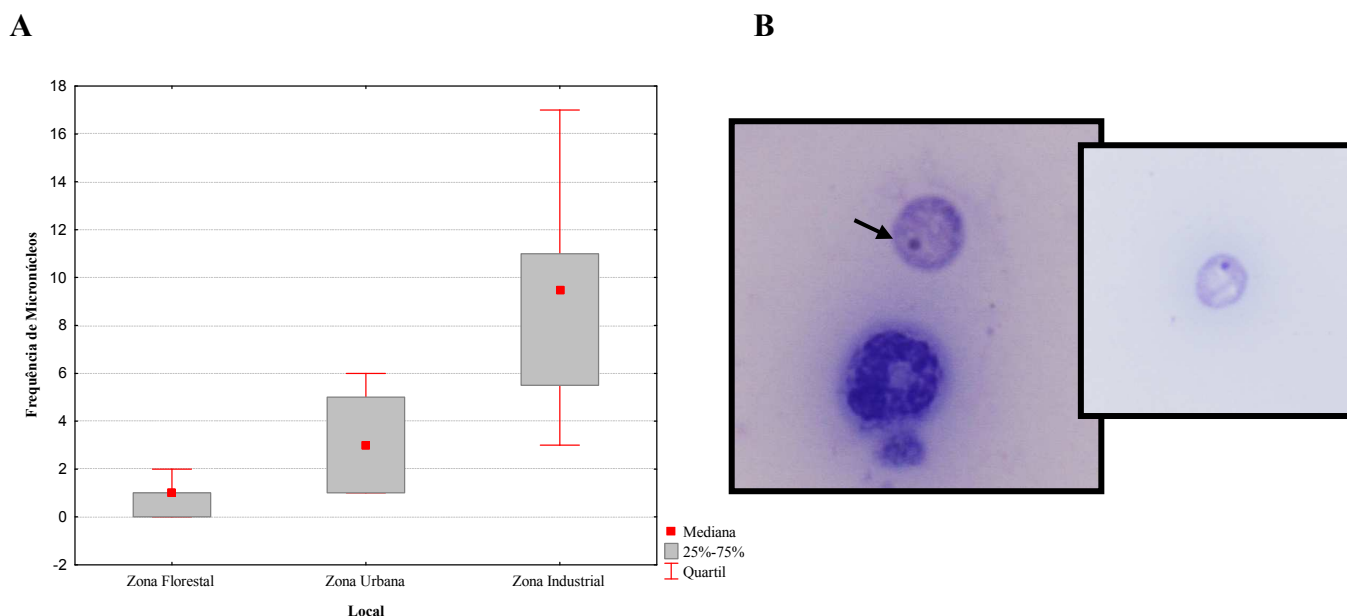


Figura 3.6. (A) Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNEPC) em 1000 eritrócitos policromáticos por local de captura; (B) Eritrócitos policromáticos micronucleados (Ampliação 100x) (seta) e célula da medula óssea.

Quadro 3.6

Médias e desvio padrão da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNEPC) em 1000 eritrócitos policromáticos dos diferentes locais de captura

	Zona Florestal	Zona Urbana	Zona Industrial
MNEPC			
Média \pm D.P.	0,73 \pm 0,7 ^a	3,14 \pm 2,7 ^a	8,56 \pm 3,2 ^b
<i>n</i>	11	7	16

D.P., desvio padrão; *n*, número de animais

Letras diferentes significam diferenças significativas para $P < 0,05$.

3.4.2 Análise das Anomalias dos Espermatozóides

Relativamente à análise dos espermatozóides, após a coloração com Giemsa a 10% e observação ao microscópio óptico, verificou-se que todas as cabeças e caudas dos mesmos se encontravam separadas o que, impossibilitou por completo, a classificação dos prováveis espermatozóides anómalos. A hipótese que parece mais consistente para a explicação deste



resultado, aponta para um artefacto da experimentação. Efectivamente, e analisando criteriosamente todos os passos do protocolo pareceu-nos existir um pequeno desequilíbrio no eixo de rotação da centrífuga utilizada. Pensa-se que terá havido, eventualmente, alterações nos *rpm* que poderão ter contribuído para a separação das cabeças e das caudas dos espermatozóides como ilustrado na Figura 3.7.

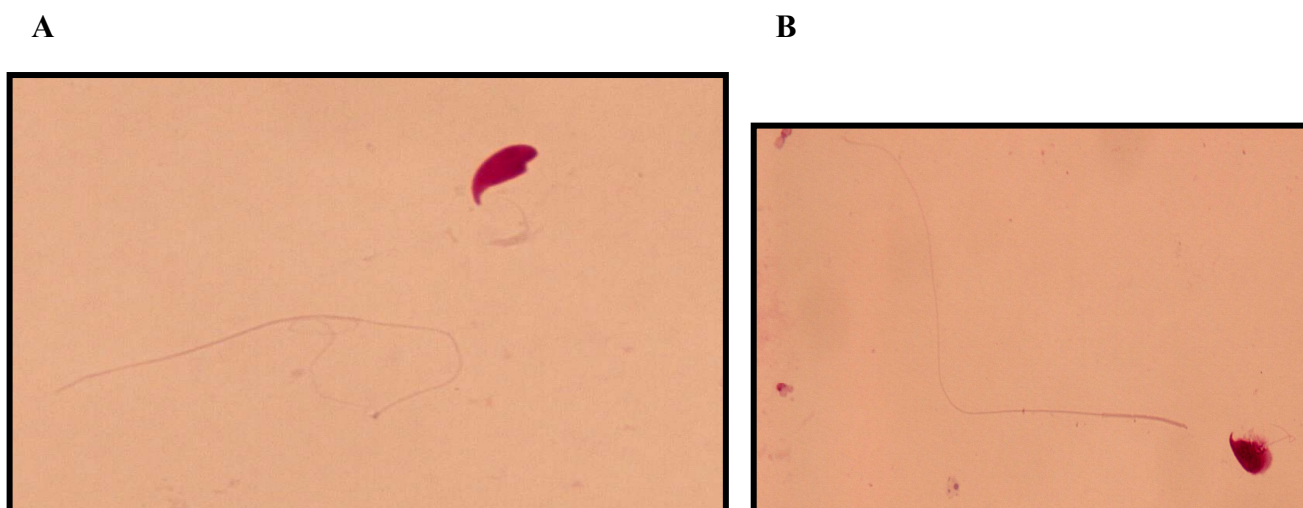


Figura 3.7. Observação microscópica de espermatozóides com cabeças e caudas separadas (ampliação 100x).

3.5 CORRELAÇÕES ESTATÍSTICAS

3.5.1 Metais pesados versus parâmetros Morfofisiológicos

No Quadro 3.7 encontram-se representadas as correlações entre as concentrações de metais encontradas no fígado e os parâmetros morfofisiológicos dos animais.

São consideradas diferenças significativas os valores para $P < 0,05$ sendo significativa a correlação negativa entre a concentração de manganês e mercúrio com comprimento e peso do corpo dos animais, significando que, quanto maior a concentração de manganês e mercúrio (Figuras 3.8 e 3.9) presente no fígado menor o comprimento e peso do corpo dos animais.

Foi igualmente significativa a correlação positiva entre o peso relativo do fígado e a concentração de cádmio e manganês, significando que, quanto maior a concentração de cádmio e manganês presente no fígado maior o peso relativo deste órgão nos animais (Figuras 3.10 e 3.11). Pelo contrário, verificou-se correlação negativa entre o peso relativo do fígado e a concentração de crómio e chumbo, também significativa.

Foram ainda observadas diferenças significativas entre peso relativo do rim direito e o cobre.



Quadro 3.7

Correlações entre as concentrações de metais e os parâmetros morfofisiológicos dos animais

	Ni	Cd	Pb	Cr	Hg	Cu	Zn	Mn
	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>N</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
Comprimento do corpo	-0,12 44	-0,19 42	0,08 44	0,23 44	-0,37* 42	0,27 44	0,17 44	-0,32* 40
	<i>p</i> =0,41	<i>p</i> =0,22	<i>p</i> =0,58	<i>p</i> =0,13	<i>p</i> =0,17	<i>p</i> =0,08	<i>p</i> =0,28	<i>p</i> =0,04
Peso do Corpo	-0,17 44	-0,22 42	0,00 44	0,15 44	-0,34* 42	0,24 44	0,14 44	-0,40* 40
	<i>p</i> =0,26	<i>p</i> =0,17	<i>p</i> =0,97	<i>p</i> =0,33	<i>p</i> =0,03	<i>p</i> =0,11	<i>p</i> =0,36	<i>p</i> =0,01
Peso relativo do fígado	-0,14 38	0,39* 36	-0,58* 38	-0,44* 38	-0,06 36	-0,30 38	-0,18 38	0,42* 34
	<i>p</i> =0,38	<i>p</i> =0,01	<i>p</i> =0,00	<i>p</i> =0,00	<i>p</i> =0,71	<i>p</i> =0,07	<i>p</i> =0,26	<i>p</i> =0,01
Peso relativo do rim Esquerdo	-0,31 38	-0,12 36	0,15 38	0,08 38	-0,09 36	0,30 38	0,24 38	-0,00 34
	<i>p</i> =0,85	<i>p</i> =0,50	<i>p</i> =0,37	<i>p</i> =0,65	<i>p</i> =0,59	<i>p</i> =0,06	<i>p</i> =0,14	<i>p</i> =0,97
Peso relativo do rim Direito	0,06 38	-0,24 36	0,31 38	0,25 38	-0,02 36	0,40* 38	0,29 38	-0,15 34
	<i>p</i> =0,72	<i>p</i> =0,15	<i>p</i> =0,06	<i>p</i> =0,13	<i>p</i> =0,26	<i>p</i> =0,01	<i>p</i> =0,07	<i>p</i> =0,38
Coefficiente de Condição Física	-0,19 44	-0,12 42	-0,08 44	-0,96 44	-0,03 42	0,04 44	0,01 44	-0,26 40
	<i>p</i> =0,22	<i>p</i> =0,47	<i>p</i> =0,59	<i>p</i> =0,53	<i>p</i> =0,82	<i>p</i> =0,80	<i>p</i> =0,93	<i>p</i> =0,10

**P* < 0,05

n, número de animais

Ni, níquel; Cd, cádmio; Pb, chumbo; Cr, crómio; Hg, mercúrio; Cu, cobre; Zn, zinco; Mn, manganês.

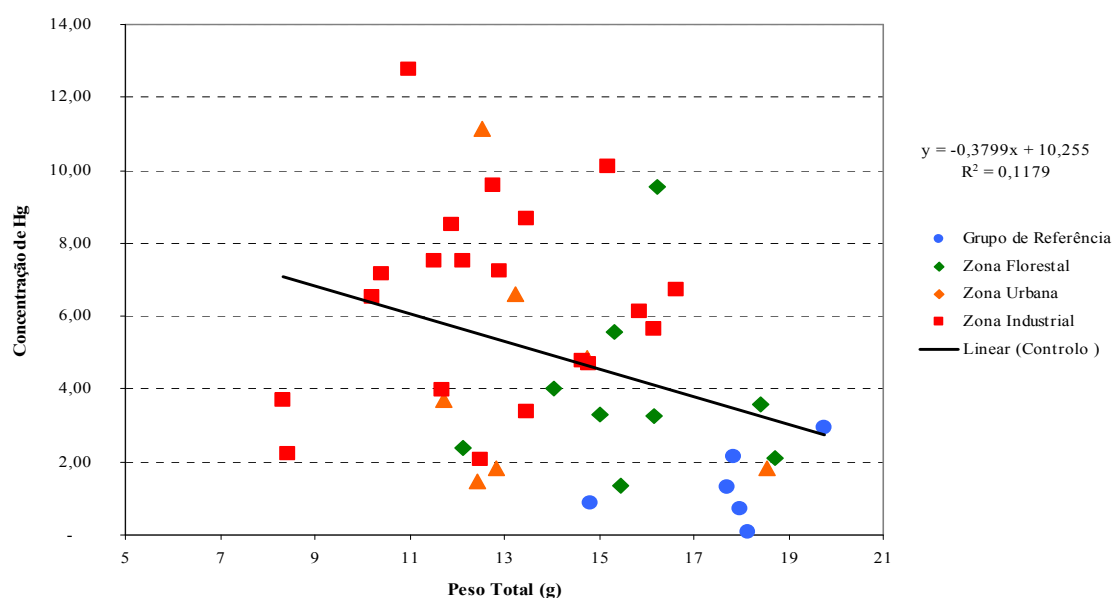


Figura 3.8. Diagrama de dispersão e modelo de regressão linear entre a concentração de mercúrio e o peso total do corpo dos animais (g) (R^2 - coeficiente de determinação).



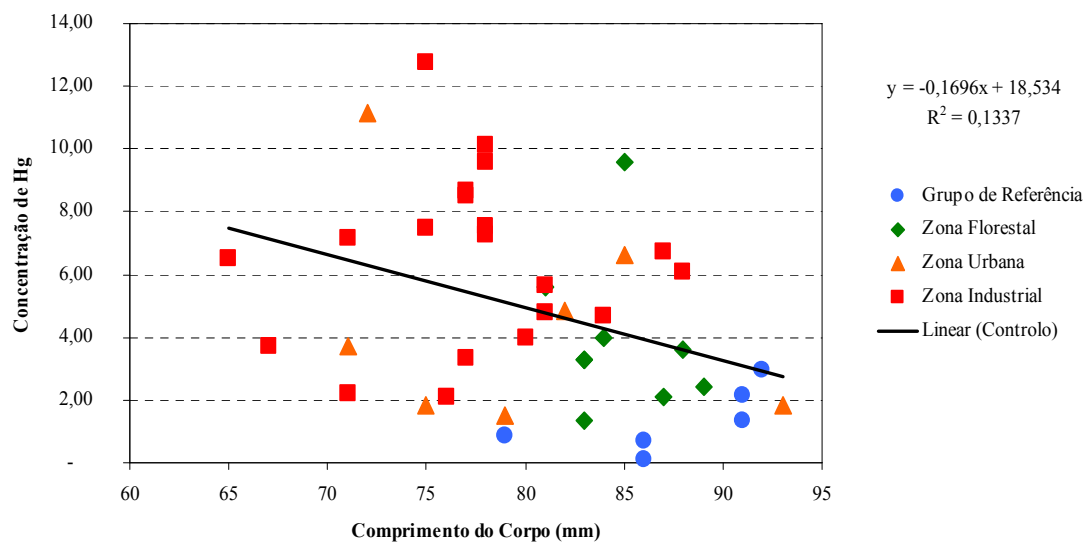


Figura 3.9. Diagrama de dispersão e modelo de regressão linear entre a concentração de mercúrio e o comprimento dos animais (mm) (R^2 - coeficiente de determinação).

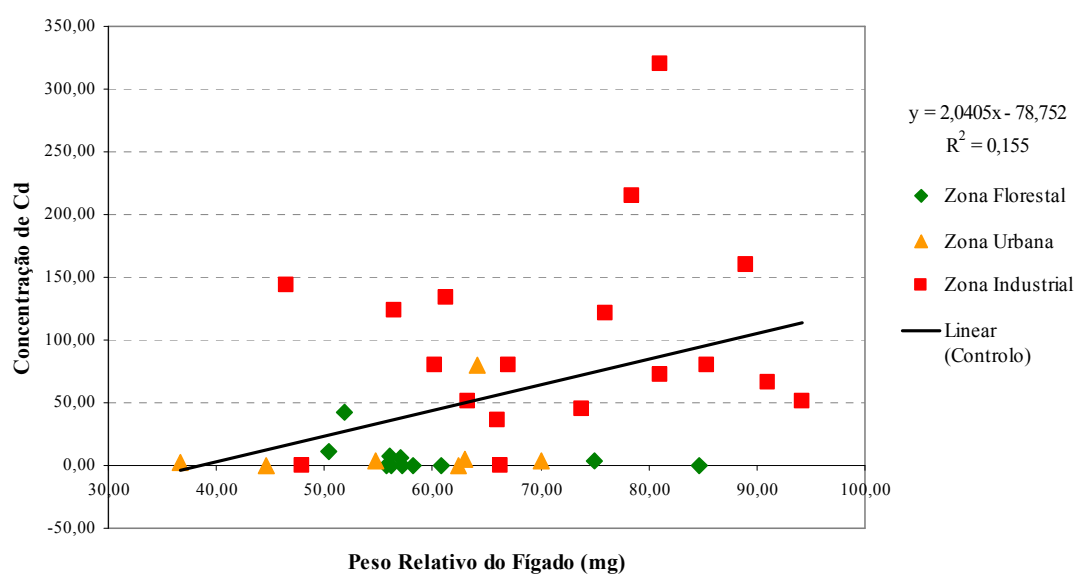


Figura 3.10. Diagrama de dispersão e modelo de regressão linear entre a concentração de cádmio e o peso relativo do fígado (mg) (R^2 - coeficiente de determinação).



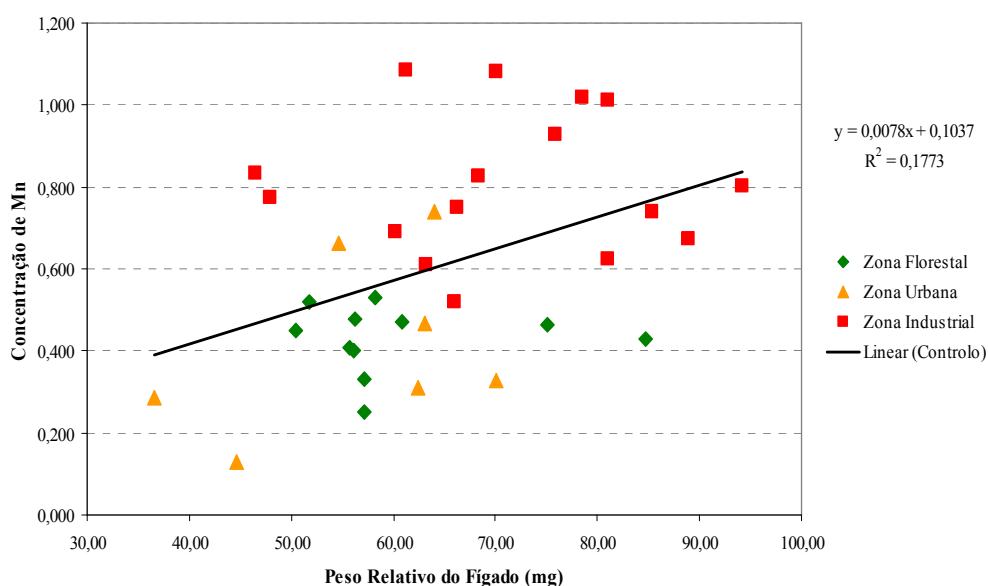


Figura 3.11. Diagrama de dispersão e modelo de regressão linear entre a concentração de manganês e o peso relativo do fígado (mg) (R^2 - coeficiente de determinação).

3.5.2 Metais pesados versus parâmetros Hematológicos e Genotóxicos

No Quadro 3.8 encontram-se representadas as correlações entre as concentrações de metais pesados encontradas e os parâmetros hematológicos e genotóxicos.

São consideradas diferenças significativas os valores para $P < 0,05$ sendo significativa a correlação positiva entre a concentração de manganês e cádmio e a frequência de micronúcleos, significando que, quanto maior a concentração de manganês e cádmio maior a frequência de micronúcleos (Figuras 3.12 e 3.13).

Contrariamente, observaram-se diferenças significativas relativamente à correlação negativa entre a concentração de cobre e zinco e a frequência de micronúcleos.



Quadro 3.8

Correlações entre as concentrações de metais pesados e os parâmetros hematológicos e genotóxicos dos animais

	Ni	Cd	Pb	Cr	Hg	Cu	Zn	Mn
	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
WBC ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	-0,13 38	0,08 36	0,05 38	0,26 38	-0,06 36	-0,11 38	0,07 38	-0,04 34
	$p=0,43$	$p=0,65$	$p=0,76$	$p=0,11$	$p=0,73$	$p=0,50$	$p=0,67$	$p=0,83$
RBC ($\times 10^6 \text{ mm}^{-3}$)	0,09 38	0,00 36	0,23 38	0,18 38	-0,08 36	-0,17 38	-0,13 38	-0,14 34
	$p=0,60$	$p=0,98$	$p=0,16$	$p=0,28$	$p=0,63$	$p=0,31$	$p=0,44$	$p=0,43$
Hgb (g/dl)	0,04 38	0,06 36	0,18 38	0,18 38	-0,14 36	-0,20 38	-0,08 38	-0,02 34
	$p=0,83$	$p=0,71$	$p=0,27$	$p=0,28$	$p=0,22$	$p=0,21$	$p=0,65$	$p=0,88$
HCT (%)	0,07 38	0,03 36	0,24 38	0,24 38	-0,15 36	-0,11 38	-0,02 38	-0,13 34
	$p=0,68$	$p=0,86$	$p=0,13$	$p=0,14$	$p=0,38$	$p=0,49$	$p=0,90$	$p=0,47$
Frequência de Micronúcleos	0,19 34	0,53* 32	-0,33 34	-0,02 34	0,20 32	-0,44* 34	-0,43* 34	0,48* 31
	$p=0,29$	$p=0,00$	$p=0,06$	$p=0,91$	$p=0,32$	$p=0,01$	$p=0,01$	$p=0,00$

* $P < 0,05$

n, número de animais

WBC ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$), glóbulos brancos; RBC ($\times 10^6 \text{ mm}^{-3}$), glóbulos vermelhos; Hgb (g/dl), concentração de hemoglobina; HCT (%), hematócrito.

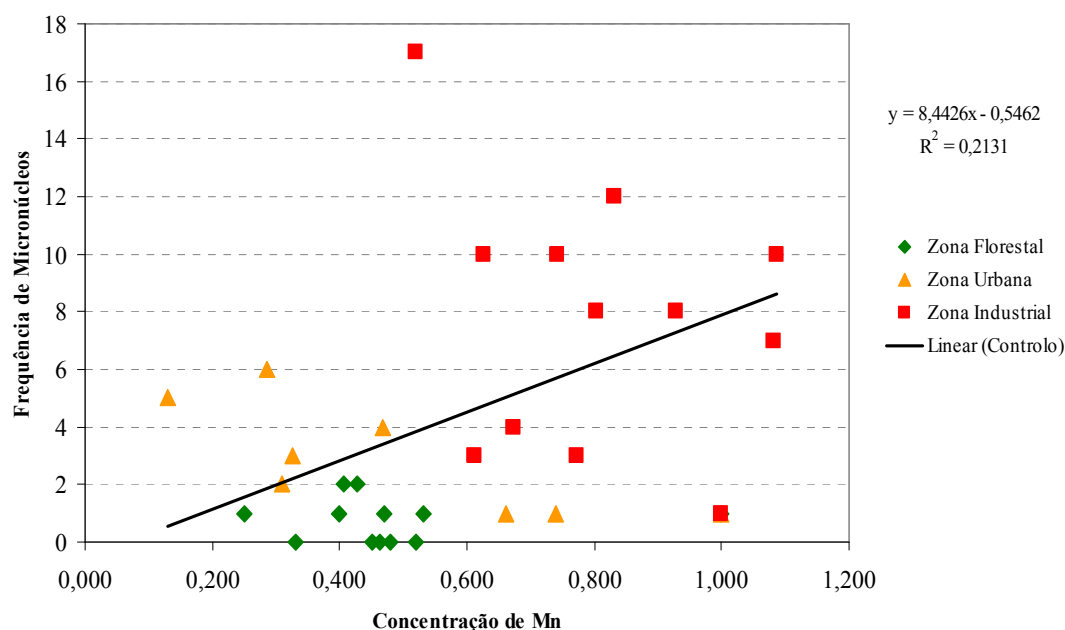


Figura 3.12. Diagrama de dispersão e modelo de regressão linear entre a concentração de manganês e a frequência de micronúcleos (R^2 - coeficiente de determinação).



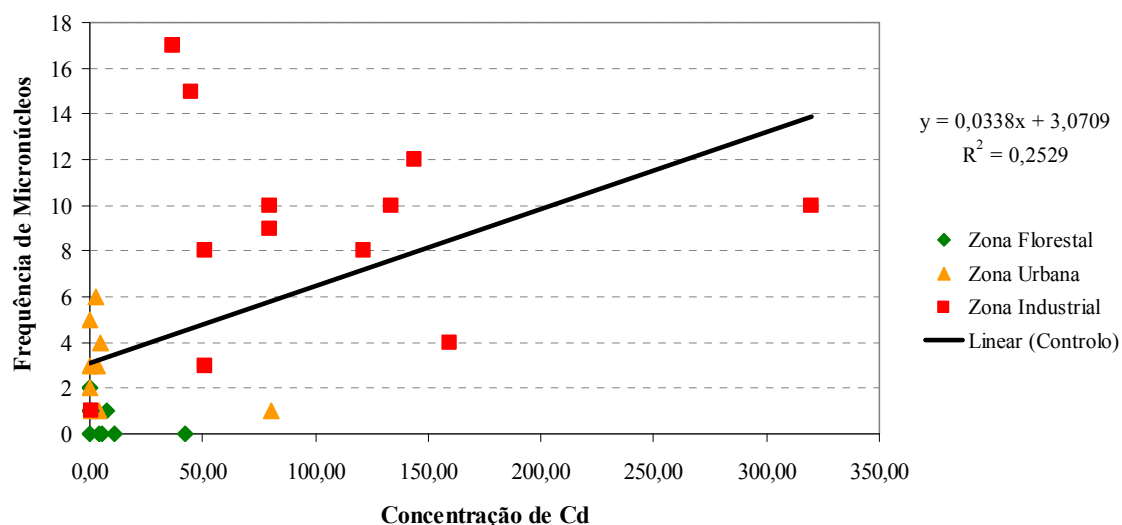


Figura 3.13. Diagrama de dispersão e modelo de regressão linear entre a concentração de cádmio e a frequência de micronúcleos (R^2 - coeficiente de determinação).

3.6 DETERMINAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES *CYP1A1* E *XRCC1* EM *MUS MUSCULOS*

A extracção, purificação e quantificação do DNA obtido de amostras de fígado dos animais estudados (número: 11,12,13,14,15,16,17,20,21,22 e 23) (Anexo IV), utilizando o kit comercial *Tissue DNA kit (Omega bio-tek)* revelou-se de bastante satisfatória como observado na Figura 3.14.

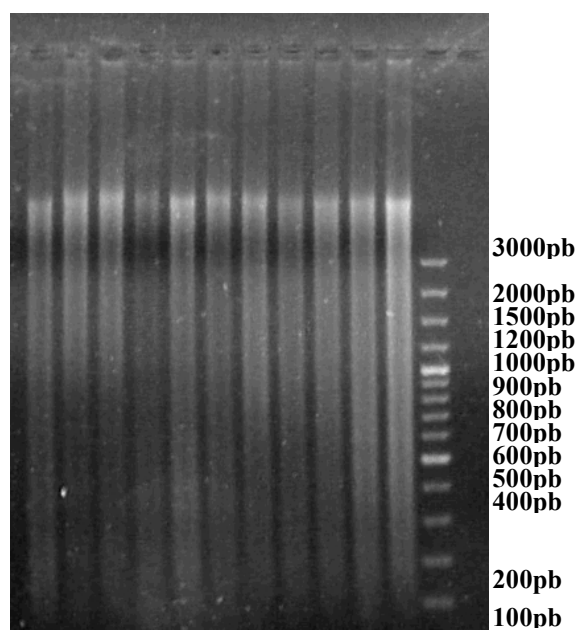


Figura 3.14. Extracção, purificação e quantificação do DNA obtido de amostras de fígado dos animais (da esquerda para a direita 11,12,13,14,15,16,17,20,21,22 e 23) em gel de agarose (diluição 30%).



Relativamente à amplificação por PCR dos polimorfismos *MspI* e *R399Q* dos genes CYP1A1 e XRCC1 respectivamente (Anexo IV), obteve-se sempre, uma grande inespecificidade dos *primers* traduzida pela presença de múltiplas bandas no gel de agarose (Figura 3.15). Contudo, verificou-se que se estava a amplificar a região pretendida visto que, o DNA controlo (humano) revelou o padrão descrito para estes dois genes no humano conforme observado na Figura 3.15.

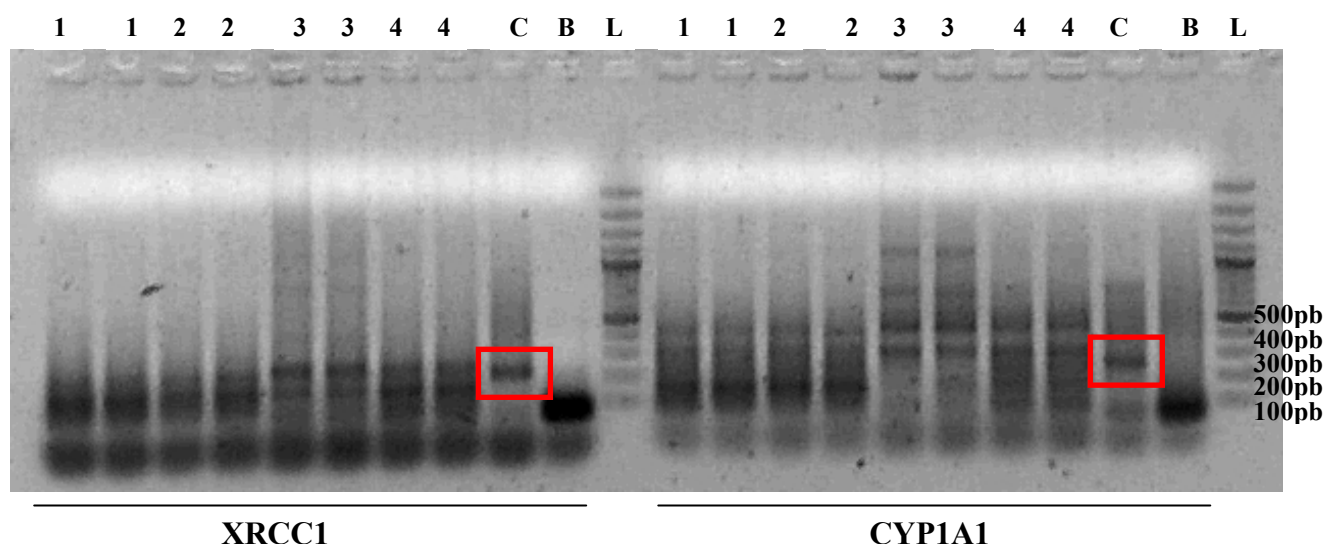


Figura 3.15. Amplificação por PCR dos polimorfismos *R399Q* (198pb) do gene XRCC1 e *MspI* (340pb) do gene CYP1A1 em gel de agarose.

1, ratinho nº2; 2, ratinho nº15; 3, ratinho nº32; 4, ratinho nº33; C, DNA controlo; B, controlo negativo; L, DNA ladder.

3.7 ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO DE PAHs:

No que diz respeito à análise dos PAHs foram preparadas quatro amostras (*pool* de cada uma das zonas em estudo: Zona Florestal - 11 indivíduos; Zona Urbana - 7 indivíduos; Zona Industrial - 20 indivíduos e Grupo de Referência - 6 indivíduos) e enviados, em Abril para a Agência Portuguesa do Ambiente (APA), em Lisboa a fim de serem analisadas. Infelizmente e após alguns contactos com os responsáveis deste laboratório de referência do Estado não foram enviados, até à data, quaisquer resultados, pelo que foi impossível fazer a sua discussão.



4. DISCUSSÃO

A Península de Setúbal foi considerada como um local prioritário para um estudo de avaliação da qualidade do ar (Augusto, 2004). A necessidade de quantificar a poluição nesta zona tornou-se imprescindível por esta ser uma das áreas industriais mais importantes do país e por possuir, simultaneamente, zonas de elevado interesse biológico e ecológico. É o caso do Parque Natural da Serra da Arrábida, situado em zona privilegiada da Península de Setúbal, que apesar da sua reduzida superfície, apresenta a amostra mais importante e significativa de antigas e espontâneas associações de matagal mediterrânico do nosso país. Nos últimos anos, as densidades populacional e industrial na área da Península de Setúbal têm vindo a aumentar consideravelmente, pondo em risco a preservação deste ecossistema. Por outro lado, a sobreposição no espaço de áreas industriais e urbanas tornou imperativa uma análise precisa, qualitativa e quantitativa, dos poluentes emitidos pelas várias industriais e que podem apresentar consequências nocivas para a Saúde Pública (Augusto, 2004).

O presente trabalho teve como base os estudos de Augusto *et al.*, (2004 e 2007) realizados com o objectivo a caracterização do estado actual da poluição atmosférica na Península de Setúbal, tendo em vista a gestão e conservação dos seus ecossistemas florestais. Estes estudos assentaram em dois vectores metodológicos principais: a biomonitorização utilizando líquenes e a modelação geoestatística. A partir dos líquenes foi possível obter dados quantitativos, que permitiram inferir a taxa de deposição regional de poluentes, nomeadamente de dioxinas, furanos e metais pesados. Das respectivas concentrações dos poluentes e diferencial distribuição pela área de estudo, foi possível construir modelos geoestatísticos que, de certo modo, representam a imagem espacial da ocorrência e intensidade destes poluentes (Anexo III).

O presente estudo dirigido à avaliação do risco da contaminação ambiental pretende ser uma contribuição para a compreensão dos efeitos destes poluentes para a saúde humana e ecossistemas, usando roedores como indicadores *in situ* da qualidade ambiental. A utilização de organismos vivos para monitorizar a poluição permite-nos, para além de quantificar os poluentes depositados, inferir sobre o seu impacto na fisiologia dos seres vivos. É neste contexto, que surge a escolha do ratinho-caseiro (*Mus musculus*) como bioindicador.

Os micromamíferos estão entre os organismos modelo mais comumente usados como sentinelas em ecossistemas terrestres (Shore e Rattner, 2001; Nunes, 2001; Sánchez-Chardi, 2008; Viegas-Crespo, 2003). As avaliações das cargas de elementos em tecidos e órgãos destes modelos têm ajudado a determinar a presença e a extensão de absorção de poluentes do meio ambiente. Os principais argumentos que apoiam a selecção destes modelos encontram-se na associação dos roedores à actividade humana e à semelhança dos processos fisiológicos que os tornam indicadores adequados na avaliação da exposição humana. Além disso, os micromamíferos representam um



estadio intermediário entre baixo e alto níveis tróficos, uma vez que constituem elementos relevantes na dieta das aves e dos mamíferos carnívoros (Metcheva, 2003).

Vários autores têm sugerido que os micromamíferos silvestres que habitam locais poluídos são mais resistentes do que os animais de laboratório (Reynolds *et al.*, 2006), podendo levar a variação intra-específica e a diferença na exposição e resposta (Talmage e Walton, 1991), contribuindo para a grande variabilidade observada nos micromamíferos silvestres em alguns parâmetros em áreas poluídas (Sánchez-Chardi *et al.*, 2007; Marques *et al.*, 2007). Assim, as populações silvestres cronicamente expostas à poluição, aparentemente, fazem uso de processos adaptativos para melhor tolerar substâncias tóxicas num ambiente em mudança (Marques *et al.*, 2007, Medina *et al.*, 2007). Todos esses factores podem complicar a interpretação dos dados ecotoxicológicos, pelo que por vezes apenas indicam tendências.

Concentrações de metais por local

Os micromamíferos têm sido amplamente utilizados como bioindicadores de contaminação por metais pesados. De facto, os animais silvestres podem fornecer valiosas informações sobre características, quantidades e tipo de substâncias químicas presentes no ambiente, e em muitos casos, tendem a responder mais rapidamente do que os seres humanos em doses baixas (National Research Council, 1991).

No presente estudo, as concentrações dos diversos metais analisados e encontrados no fígado dos roedores foram consistentes com o material de referência Bovine Liver SRM-1577b também analisado por espectrofotometria de absorção atómica (Anexo VI).

As mesmas concentrações foram igualmente consistentes com os modelos geoestatísticos dos estudos realizados anteriormente por Augusto *et al.*, 2004 e 2007 (Anexo III).

Foram encontradas diferenças significativas entre os locais de captura para os elementos altamente tóxicos cádmio, manganês, chumbo, mercúrio e cobre. As concentrações mais elevadas de cádmio, mercúrio e manganês foram encontradas na Zona Industrial, estando de acordo com os poluentes emitidos pelas indústrias anteriormente localizadas perto do local, actualmente desactivadas (Augusto *et al.*, 2004). Comprovando, assim, que aquele local constitui uma fonte de contaminação por metais pesados a longo prazo.

A maior concentração de chumbo e cobre foi encontrada na Zona Urbana estando igualmente de acordo com as emissões atmosféricas de gases e partículas metálicas provenientes do tráfego rodoviário dado a proximidade do local à auto-estrada (A2) (Augusto *et al.*, 2004).

O chumbo e cádmio são elementos não-essenciais, amplamente distribuídas em todo ecossistema e que afectam uma ampla gama de funções fisiológicas, incluindo sistemas nervoso,



excretor, reprodutivo e hematopoiético. A bioacumulação de chumbo e cádmio no fígado e rins de micromamíferos em áreas poluídas, tem sido relatada (Torres *et al.*, 2006; Sánchez-Chardi e Nadal, 2007).

Não foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes locais para os restantes elementos quantificados.

A exposição dos humanos aos metais pesados pode ocorrer essencialmente por três vias no ambiente: através da inalação de ar, da ingestão de água ou da ingestão de alimentos que contenham estes elementos. As autoridades europeias e nacionais acompanharam a evolução dos conhecimentos sobre a toxicidade dos metais pesados e do seu potencial risco para a saúde tendo implementado directivas e regulamentos com o objectivo de regular as quantidades máximas de metais a que o ser humano deve estar exposto (Anexo V). Neste sentido, também se têm desenvolvido esforços para a realização de programas de monitorização para avaliar o grau de poluição dos solos, da água e do ar (Augusto, 2004).

A ingestão através da dieta é reconhecida como a principal fonte de metais presentes no ambiente em micromamíferos (Hunter *et al.*, 1987; Ma, 1989). No entanto, a transferência de metais do meio ambiente para os mamíferos terrestres depende de vários factores abióticos e bióticos, como a estação do ano, a espécie envolvida, a sua dieta, idade, sexo, estado reprodutivo e condição fisiológica (Hunter *et al.*, 1987; Lopes *et al.*, 2002; Viegas-Crespo *et al.*, 2003; González *et al.*, 2008). Conjuntamente as interacções entre os metais são bem conhecidas e precisam ser consideradas (Bellés *et al.*, 2002). As interacções metal-metal podem ser antagónicas, sinérgicas, ou não interactivas, afectando em ambos os casos a toxicidade e a bioacumulação dos metais (Wang and Fowler, 2008). Os estudos realizados em laboratório podem ajudar a estabelecer relações de causa-efeito úteis, para verificar e prever os efeitos sobre as populações silvestres, embora a maioria dos dados publicados sobre testes de toxicidade de metais esteja focado sobre os efeitos individuais destes (Pyatskowitz e Prohaska, 2008).

Neste contexto, a comparação entre valores máximos de metais descritos nas directivas e regulamentos da legislação europeia e nacional e as concentrações encontradas neste estudo é incorrecta dado que a transferência destes metais do meio ambiente para os animais, está também dependente de outros factores que não foram aqui avaliados.

Análise Morfofisiológica

A análise morfológica revelou que os indivíduos da Zona Florestal apresentavam um melhor estado de saúde, reflectido nos valores de peso e comprimento superiores, e valores positivos do coeficiente de condição física, acima da linha de regressão. Os resultados obtidos nos diferentes



locais de captura são semelhantes aos reportados por outros autores para micromamíferos que habitam locais poluídos e de referência (Ma, 1989; Milton *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2006; Sánchez-Chardi *et al.*, 2007).

Não foram encontradas diferenças significativas nos coeficientes de condição física dos diferentes locais indicando um *fitness* idêntico entre os animais. No entanto, os animais da Zona Industrial apresentavam um coeficiente de condição física inferior (K) e, como tal, um peso corporal inferior ao esperado (Alcântara e Díaz, 1996).

No que respeita ao peso relativo do fígado, não foram encontradas diferenças significativas para os diferentes locais de captura. Contudo, verificou-se uma tendência de aumento do peso relativo do fígado com o aumento da contaminação local, o que pode ser indicativo de edema hepático (Milton *et al.*, 2003). Enquanto o índice de condição física é uma medida das reservas energéticas e da qualidade ambiental, mudanças no peso relativo dos órgãos pode indicar a exposição a níveis de metais tóxicos (Ma, 1989; Ma e Talmage, 2001).

O fígado e os rins são os principais órgãos envolvidos nos processos metabólicos de metais pesados tóxicos, tais como biotransformação, bioacumulação, desintoxicação e excreção. A metabolização de substâncias xenobióticas é efectuada através das reacções de fase I e de fase II em que os compostos sofrem respectivamente hidroxilação e conjugação. Os produtos finais são excretados pela via biliar ou através da urina (Ma e Talmage, 2001; D'Havé *et al.*, 2006).

Em conformidade o aumento do peso relativo do fígado nos animais com maior concentração de metais, poderá dever-se à hiperplasia do órgão no intuito de proporcionar, na medida do possível, uma satisfatória degradação do composto.

Quanto ao peso relativo dos rins, não foram observadas diferenças significativas entre os locais de estudo. Contudo, nos locais onde se encontraram maiores concentrações de chumbo e crómio (Zona Urbana e Florestal) observaram-se os valores mais elevados do peso relativo dos rins. Este aumento tem sido referenciado em rins de musaranhos com níveis extremamente elevados de chumbo (Ma, 1989; Ma e Talmage, 2001) o que poderá, ser indicativo de edema renal, provocado pela exposição aos elementos ou compostos em níveis tóxicos.

A taxa de distribuição de poluentes em diferentes órgãos depende do fluxo sanguíneo em cada órgão pelo que, os órgãos com maior fluxo sanguíneo (fígado e rim) tendem a acumular xenobióticos mais facilmente do que a de baixo fluxo sanguíneo (tecido muscular) (Pritchard, 1993).

Parâmetros Hematológicos e Genotóxicos

Os valores registados para os parâmetros hematológicos estão de acordo com a literatura disponível sobre espécies de micromamíferos (Sánchez-Chardi *et al.*, 2008).



Não foram encontradas diferenças significativas entre os locais de estudo para a concentração de glóbulos vermelhos e brancos, apesar do valor médio ($3,6 \times 10^3 \text{ mm}^{-3}$) mais elevado de glóbulos brancos ter sido detectado na Zona Industrial.

Na verdade, a homeostasia dos sistemas de mamíferos sob exposição crônica à poluição ambiental pode diminuir e / ou atenuar as diferenças nas populações silvestres, em contraste com animais de laboratório, que muitas vezes mostra diferenças quando agudamente expostos a metais (Jadhav *et al.*, 2007, Medina *et al.*, 2007; Włostowski *et al.*, 2003).

A concentração de glóbulos brancos (WBC) observada em ratinhos submetidos à poluição atmosférica pode indicar uma resposta a processos inflamatórios e / ou infecção. O aumento médio no número de glóbulos brancos nos animais da Zona Industrial poderá indicar que estes animais são mais susceptíveis à inflamação e infecção bacteriana ou viral (Gorriz *et al.*, 1995).

Foram ainda, observadas diferenças significativas na concentração de hemoglobina e hematócrito, sendo a Zona Florestal o grupo com maior concentração destes parâmetros, indicando que os animais apresentam maior quantidade de glóbulos vermelhos em circulação para o volume de sangue total.

A diminuição do hematócrito e o aumento do número de glóbulos brancos observado na Zona Industrial está de acordo com os efeitos da poluição atmosférica nos parâmetros hematológicos em *Mus musculus* anteriormente descritos. (Gorriz *et al.*, 1995)

Vários estudos relataram alterações dos parâmetros hematológicos em, *Mus spretus*, *Mus musculus*, *Apodemus sylvaticus* e *Thomomys talpoides*, habitando locais poluídos (Sánchez-Chardi *et al.*, 2008).

A frequência de micronúcleos obtida ($0,73 \pm 0,7$, $3,14 \pm 2,7$ e $8,56 \pm 3,2$ dos locais Zona Florestal, Zona Urbana e Zona Industrial respectivamente) para os diferentes locais de captura está de acordo com dados anteriormente publicados em diferentes espécies de micromamíferos (Sánchez-Chardi e Nadal, 2007). Esta constância de resultados reforça a opinião, já generalizada, de muitos investigadores de que as populações de roedores são bioindicadores apropriados para estudos de genotoxicidade (Sheffield *et al.*, 2001; Hamers *et al.*, 2006; Scheirs *et al.*, 2006).

Tal como em estudos anteriores (Materiy e Maslova, 1978; Cristaldi *et al.*, 1985; Paradisi *et al.*, 1986) com espécies de roedores silvestres em que foi verificado um aumento da frequência de micronúcleos na medula óssea de animais recolhidos em locais contaminados, também neste trabalho se verificou a mesma tendência. A reforçar esta hipótese, os valores obtidos, ($0,73 \pm 0,7$, $3,14 \pm 2,7$ e $8,56 \pm 3,2$ dos locais Zona Florestal, Zona Urbana e Zona Industrial respectivamente), são no mesmo sentido dos detectados em *Mus musculus* colectados em Chernobil (Cristaldi *et al.*, 1990) e em zonas de elevado tráfego urbano (Ieradi *et al.*, 1991).



Metais pesados versus parâmetros morfofisiológicos

O fígado é o principal órgão de armazenamento e metabolismo *in vivo* do cádmio. Produz metalotioneína, que é então libertada para a circulação com posterior transporte para o rim, bem como de outros órgãos (Nordberg *et al.*, 2007).

Os efeitos hepatotóxicos induzidos pelo cádmio foram relatados, em modelos animais experimentais em condições de exposição elevada *in vivo* (Yu *et al.*, 2007) e em *in vitro* (Lasfer *et al.*, 2008; Badisa *et al.*, 2008).

O cádmio tem sido associado a uma elevada gama de respostas toxicológicas no fígado de micromamíferos, que incluem o stress oxidativo, lesão aguda, apoptose e necrose (Pankakoski *et al.*, 1993; Stansley e Roscoe, 1996; Milton *et al.*, 2003).

Neste contexto, a correlação positiva (0,39 $p=0,01$) entre a concentração de cádmio e o aumento do peso relativo do fígado poderá dever-se à acumulação deste elemento neste órgão.

A correlação negativa (-0,58 $p=0,00$) encontrada relativamente à concentração de outro metal altamente tóxico, o chumbo, e a diminuição do peso relativo do fígado poderá estar relacionada com a maior concentração deste elemento nos rins do que no fígado (Pankakoski *et al.*, 1994).

No entanto, o mecanismo molecular de toxicidade subjacente não é totalmente compreendido (Smith *et al.*, 1998). A persistência deste contaminante no ambiente aconselha à avaliação detalhada dos riscos para a vida silvestre e humana. O chumbo é um metal que afecta especialmente o sistema hematopoiético mas também pode afectar outros sistemas e tecidos como o neurológico, cardiovascular, gastrointestinal, urinário bem como o sistema reprodutivo (Simmonds, 1994).

Estudos de Sánchez-Chardi e Nadal, (2007) revelaram que populações de micromamíferos, provenientes de áreas poluídas por metais pesados apresentam valores de comprimento e peso corporal menos elevados comparativamente a indivíduos de locais de referência. Os valores encontrados neste trabalho vem corroborar esta indicação (o mercúrio e manganês apresentam correlação negativa significativa em relação ao comprimento e peso dos animais). O mercúrio é um potente indutor de neurotoxicidade retardada, pois mesmo após anos de cessação à exposição ainda se fazem sentir os seus efeitos tóxicos (Kakkar e Jaffery, 2005).

Em conclusão e dada a elevada toxicidade para os seres vivos pelo seu efeito carcinogénico e de stress oxidativo, os metais pesados como o cádmio, chumbo e mercúrio devem ser alvo de monitorização constante (Karmakar e Chatterjee, 1998; Silbergeld, 2003).

Metais pesados versus parâmetros genotóxicos

Foi encontrada uma correlação positiva significativa entre a concentração de cádmio e manganês e a frequência de micronúcleos o que está de acordo com outros estudos relativamente



recentes Ieradi *et al.*, (1996), Sánchez-Chardi e Nadal (2007) e Tapisso *et al.*, (2009) que encontraram fortes correlações entre vários metais pesados e frequência micronúcleos em eritrócitos de *Mus musculus* e outros micromamíferos.

Estas correlações parecem confirmar que estes elementos contribuem para os efeitos clastogénicos em mamíferos silvestres (Seoane e Dulout, 2001; Palus *et al.*, 2003). Para o cádmio, potente agente genotóxico os seus efeitos são dependentes do tempo de exposição, provavelmente devido à incapacidade dos animais eliminarem este metal (Johannesson, 2002). No entanto, os mecanismos de genotoxicidade não são totalmente compreendidos. A inibição da reparação do DNA tem sido identificada como um dos principais mecanismos que contribuem para o potencial genotóxico deste metal, interagindo com o locais de ligação de metais de proteínas envolvidas neste processo (Hartwig, 2002). Além disso, outras possibilidades têm sido avançadas como desencadeante da peroxidação lipídica, o que pode levar à formação de adutos pré-mutagénicos no DNA (Manca, 1991).

A elevada frequência de micronúcleos em ratinhos de laboratório expostos a ambientes degradados de origem doméstica e industrial pode ser induzida pelos radicais livres produzidos pelo stress oxidativo em resposta à exposição dos metais aí existentes (Li *et al.*, 2006).

Neste contexto, os resultados obtidos neste estudo vêm comprovar que populações silvestres de micromamíferos são bioindicadores de danos genotóxicos adqueados (Sheffield *et al.*, 2001; Hamers *et al.*, 2006; Scheirs *et al.*, 2006).

As correlações negativas encontradas entre micronúcleos e elementos essenciais como o cobre e o zinco, podem ser explicadas em parte, pela protecção e / ou efeito antagónico entre estes elementos e as respectivas concentrações (Sánchez-Chardi *et al.*, 2008).

Polimorfismos dos genes CYP1A1 e XRCC1

A optimização para amplificação dos genes nucleares CYP1A1 e XRCC1 propostos para este estudo, não foi conseguida com sucesso. Foram feitas várias tentativas de optimização da técnica fazendo variar as temperatura utilizadas, a duração dos diferentes ciclos, a concentração de magnésio (MgCl₂), de *bovine serum albumin* (BSA), a quantidade de DNA e de *primers* na solução final.

Constrangimentos de ordem administrativa (data de entrega desta dissertação) não permitiram continuar as experiências numa tentativa de se encontrar as condições ideais de amplificação. Contudo, verificando haver, em todos os géis, um grande arrastamento das amostras e depois de serem alteradas muitas das variáveis envolvidas observou-se que, as aliquotas de BSA estavam mal etiquetadas. Efectivamente, a concentração real era aproximadamente 100 vezes superior ao que estava registado e ao que é necessário para este tipo de reacções. Outra hipótese que também foi



levantada para este mau resultado poderá estar relacionada com o órgão escolhido para extracção do DNA, visto que o fígado apresenta um elevado número de inibidores de PCR. Também os *primers* utilizados (não específicos para *Mus musculus*) poderão não estar a emparelhar na zona pretendida.

Num futuro próximo, considera-se a hipótese de se insistir nesta optimização a fim de se confirmar ou não, a existência de polimorfismos nos genes CYP1A1 e XRCC1 para os animais deste estudo, sujeitos à contaminação ambiental por PAHs e metais pesados.



- O presente trabalho constitui um contributo, para o conhecimento do impacto que zonas industriais e urbanas, podem exercer sobre populações silvestres de micromamíferos *Mus musculus* e, com a devida prudência, inferir a sua influência na saúde ambiental e humana.
- A concentração de elementos não-essenciais e essenciais no tecido hepático dos *Mus musculus* capturados prova que pode haver um risco tóxico associado ao local em que habitam. Além disso, os efeitos cumulativos e / ou interações entre metais potencialmente tóxicos com outros componentes não devem ser ignorados.
- Os metais pesados identificados podem apresentar elevado impacto ambiental por serem facilmente biodisponíveis para os organismos vivos. A espécie em estudo é presa importante de aves e mamíferos de grande porte e, conseqüentemente, fornece um veículo de transporte para níveis tróficos mais elevados e de transferência de metais para a cadeia alimentar.
- Este estudo fornece ainda, valores de referência para a espécie analisada (*Mus musculus*), permitindo futuras comparações com outras populações de micromamíferos.
- A biomonitorização da poluição usando mamíferos silvestres é fundamental para uma avaliação rigorosa do impacto ambiental e melhorar a nossa compreensão acerca da capacidade de resposta das populações naturais aos vários tipos de poluição.

Os resultados do presente estudo reforçam a importância do ratinho-caseiro (*Mus musculus*) como bioindicador na avaliação da qualidade ambiental. Considerando a posição do *Mus musculus* na cadeia alimentar, podemos especular acerca da acumulação de metais pesados em níveis tróficos superiores e construir cenários de biomagnificação para diferentes níveis da cadeia. Assim, o potencial risco para os ecossistemas naturais intervencionados e para a saúde pública, de áreas industriais e urbanas não podem ser ignorados e devem ser a base das decisões políticas para estas áreas.

Como nota final e embora tenham surgidos impedimentos alheios à nossa vontade que nos impediram de trabalhar dados referentes à toxicidade dos PAHs e efeitos sobre os genes CYP1A1 e XRCC1 cremos, ser um trabalho que contribui para um melhor conhecimento da zona do Arco Ribeirinho Sul, recentemente proposta em reunião do Conselho de Ministros, como área a recuperar para fins de habitação, comércio, serviços e de uso público.



5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Segundo a área científica em que se enquadra este estudo, Ecotoxicologia, seleccionou-se a revista científica *Science of the Total Environment* desta especialidade de modo a seguir o formato das referências bibliográficas.

- Agência Portuguesa do Ambiente.** Relatório do Estado do Ambiente 2007. Portugal. Versão Online no site: <http://www.apambiente.pt>.
- Alcántara M, Díaz M.** Patterns of body weight, body size, and body condition in the wood mouse *Apodemus sylvaticus* L.: effects of sex and habitat quality. Proceedings of the European Congress of Mammalogy, Museu Bocage, Lisboa; 1996. p. 141-149.
- Alloway BJ e Ayres, DC.** Chemical Principles of Environmental Pollution. Oxford: Blackie Academic & Professional; 1993.
- Anderson S, Sadinski W, Shugart L, Brussard P, Depledge M.** Genetic and Molecular Ecotoxicology: A Research Framework. Environmental Health Perspectives 1994;102(12):3-8.
- Apostoli P.** Elements in environmental and occupational medicine. Journal of Chromatography B 2002;778:63–97.
- ATSDR.** Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). U.S. Department of Health and Human Services Case Studies in Environmental Medicine (CSEM); 2009. Versão Online: <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/pah/index.html>.
- ATSDR.** Biennial Report to Congress 1991 and 1992. Agency for Toxic Substances and Disease Registry US Department of Health and Human Services, Atlanta; 1993.
- Augusto S, Branquinho C, Pereira MJ, Soares A, Catarino F.** Dioxinas e Furanos na Península de Setúbal: os Líquenes e os Modelos Geostatísticos como Instrumentos de Avaliação das áreas mais Contaminadas. Revista Faculdade de Medicina de Lisboa 2004;9(4):293-304.
- Augusto S, Catarino F, Branquinho C.** Interpreting the dioxin and furan profiles in the lichen *Ramalina canariensis* Steiner for monitoring air pollution. Science of the Total Environment 2007;377:114-123.
- Augusto S, Pereira MJ, Soares A, Branquinho C.** The contribution of environmental biomonitoring with lichens to assess human exposure to dioxins. International Journal of Hygiene and Environmental Health 2007;210:433-438.
- Augusto S, Pinho P, Branquinho C, Preira MJ, Soares A, Catarino F.** Atmospheric dioxin and furan deposition in relation to land-use and other pollutants: A survey with lichens. Journal of Atmospheric Chemistry 2004;49:53-65.



- Badisa VL, Latinwo LM, Odewumi CO, Ikediobi CO, Badisa RB, Brooks-Walter A, Lambert AT, Nwoga J.** Cytotoxicity and stress gene microarray analysis in cadmium-exposed CRL-1439 normal rat liver cells. *International Journal of Molecular Medicine* 2008;22:213–219.
- Bankowska J, Hine C.** Retention of lead in the rat. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 1985;14:621-629.
- Bellés M, Albina ML, Sánchez DJ, Corbella J, Domingo JL.** Interactions in developmental toxicology: effects of concurrent exposure to lead, organic mercury, and arsenic in pregnant mice. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 2002;42:93-98.
- Bigger CA, Ponten I, Page JE.** Mutational spectra for polycyclic aromatic hydrocarbons in the supF target gene. *Mutation Research* 2002;450:75-93.
- Bjerrum N.** Bjerrum's Inorganic Chemistry. 3rd Danish eds. Heinemann London; 1936.
- Bonassi S, Ugolini D, Kirsch-Volders M.** Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future perspectives. *Environmental Molecular Mutagen* 2005;45:258-270.
- Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N.** An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 2007;28:625-631.
- Bower JJ, Leonard SS, Shi X.** Conference overview: Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2005;279(3):3-15.
- Branquinho C, Gaio-Oliveira G, Augusto S, Pinho P, Máguas C, Correia O.** Biomonitoring spatial and temporal impact of atmospheric dust from a cement industry. *Environmental Pollution* 2008;151:292-299.
- Braun S, Appel LG, Schmal M.** A Poluição gerados por máquinas de combustão interna movidas a Diesel – A questão das partículas. Estratégias actuais para a redução e controlo das emissões e tendências futuras. *Química Nova* 2004;27(3):472-482.
- Bueno AM, Pereira CA, Rabello-Gay MN.** Environmental genotoxicity evaluation using cytogenetic end points in wild rodents. *Environmental Health Perspectives* 2000;108:1156-1169.
- Buss FD, Baptista DF, Nessimian JL.** Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. *Cadernos de Saúde Pública* 2003;19(2):465-473.
- Butkiewicz D, Rusin M, Enewold L, Shields PG.** Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung. *Carcinogenesis* 2001;22(4):593-597.
- Calderon J, Ortiz-Perez D, Yanez L.** Human exposure to metals. Pathways of exposure, biomarkers of effect, and host factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*



2003;56:93–103.

Câmara Municipal do Barreiro – Quimiparque – Uma estratégia de desenvolvimento urbanístico. Versão online:

<http://www.quimiparque.pt/images/Projecto%20Quimiparque/Relatorio%20equipa%20tecnica%20-%20estrategia%20desenvolvimento.pdf>.

Carrilho E, Formenton-Catai AP, Lançasa FM. dGMP-BPDE DNA Adduct investigation in environmental exposed rural workers by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2005;16(2):220-226.

Clancy L, Goodman P, Sinclair H. Effect of air-pollution control on death rates in Dublin, Ireland: an intervention study. *Lancet* 2002;360:1210-1214.

Costa RMA, Menk CFM. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. *Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento* 2000;12:24-26.

Cristaldi M, D’Arcangelo E, Ieradi LA. ¹³⁷Cs determination and mutagenicity tests in wild *Mus musculus domesticus* before and after the Chernobyl accident. *Environmental Pollution* 1990;64:1-9.

Cristaldi M, Ieradi LA, Licastro E, Lombardi Boccia G, Simeone G. Environmental impact of nuclear power plants on wild rodents. *Acta Zoologica Fennica* 1985;173:205-207.

Cristaldi M, Ieradi LA, Paradisi S, Tommasi M. Rodents as biological indicators of environmental impact. In: *Proceedings of the Second Symposium of recent advances in rodent control Kuwait*; 1986.

D’Havé H, Scheirs J, Mubiana VK, Verhagen R, Blust R, Coen W. Non-destructive pollution exposure assessment in the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*): II. Hair and spines as indicators of endogenous metal and As concentrations. *Environmental Pollution* 2006; 142:438–448.

De Buck SS, Bouche FB, Brandenburger A. Modulation of the metabolism and adverse effects of benzo[a]pyrene by a specific antibody: a novel host factor in environmental. *Carcinogenesis* 2005;26(4):835-844.

Del Razo LM, Corona JC, García-Vargas G, Albores A. Fluoride levels in well-water from a chronic arsenicism area of northern Mexico. *Environmental Pollution* 1993;80:91-94.

Department of the Environment Transport and the Regions. Statistics Release 184 UK Air Emissions Estimates; 1999.

Depledge MH. Genotypic toxicity: implications for individuals and populations. *Environmental Health Perspectives* 1994;102:101-104.



- Devor DE, Henneman JR, Kurata Y, Rehm S, Weghorst CM, and Ward JM.** Pathology procedures in laboratory animal carcinogenesis studies. In: Carcinogenesis 1994, Waalkes MP and Ward JM (ed). Raven Press, Ltd, New York. p.429-466
- Díaz-Barriga F.** Arsenic-increased lipid peroxidation in rat tissues by a mechanism independent of glutathione levels. *Environmental Health Perspectives* 1995;103(1):85–88.
- Directiva 2004/107/CE** do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de Dezembro de 2004, relativa ao arsénio, ao cádmio, ao mercúrio, ao níquel e aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos no ar do ambiente. *Jornal Oficial da União Europeia* 2004;23:3-16.
- Divine KK, Gilliland FD, Crowell RE, Stidley CA, Bocklage TJ, Cook DL, Belinsky SA.** The XRCC1 399 glutamine allele is a risk factor for adenocarcinoma of the lung. *Mutation Research* 2001;461:273-278.
- Duffus JH.** “Heavy Metals” – A Meaningless Term? *Pure and Applied Chemistry* 2002;74:793-807.
- Du Four VA, Janssen CE, E. Brits N.** Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples from different rural, urban and industrial sites in Flanders, Belgium, *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental* 2005;588:106–117.
- Envagelista E.** Versão Online no site: <http://ambiente.hsw.uol.com.br/substancias-toxicas4.htm> 2008.
- Environmental Protection Agency (EPA).** Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.5395. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, USA; 1998. p1-12.
- European Commission – Health and Consumer Protection.** Versão Online: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out154_en.pdf.
- Evans HJ, Neary CJ, Williamson FS.** *International Journal Radiation Biology*. 3ª ed; 1959. p.216.
- Fenech,** The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* 2000;455:81–95.
- Figueiredo JC, Knight JA, Briollais L, Andrulis IL.** Polymorphisms XRCC1-R399Q and XRCC3-T241M and the risk of breast cancer at the Ontario Site of the breast cancer family registry. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2004;13(4):583-591.
- Friberg L, Nordberg G, Vouk V.** *Handbook on the Toxicology of Metals*. North-Holland: Biomedical Press; 1979.
- Galindo TPS.** Teste de micronúcleos e anormalidades nucleares em *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Pisces Teleostei) na avaliação de genotoxicidade no litoral da cidade de Salvador-BA. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências biológicas) – Faculdade de Tecnologia e Ciências; 2007.
- Gioda A, Neto FRA.** Comments on studies of industrial and non-industrial environments in Brasil: a comparative approach. *Caderno de Saúde Pública* 2003;19 (5):1389-1397.



- González XI, Aboal JR, Fernández JA, Carballeira A.** Evaluation of some sources of variability in using small mammals as population biomonitors. *Chemosphere* 2008;11:2060-2067.
- Goode EL, Ulrich CM, Potter JD.** Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2002;11:1513-1530.
- Goodsel DS.** The molecular Perspective: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Stemcells* 2004;22: 873-874.
- Gorriz A, Llacuna S, Riera M, Nadal J.** Effects of air pollution on hematological and plasma parameters in *Apodemus sylvaticus* and *Mus musculus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 1996;31:153-158
- Grimaldo M, Borja V, Ramírez AL, Ponce M, Rosas M, Díaz-Barriga F.** Endemic fluorosis in San Luis Potosí, Mexico. I. Identification of risks factors associated with human exposure to fluoride. *Environmental Reaserch* 1995;68:25-30.
- Goyer RA, Leonard DL, Moore JF, Rhyne B, Krigman M.** Lead dosage and the role of the intranuclear inclusion body. *Arch Environ Health* 1970;20:705-711.
- Hamers T, Van den Berg JHJ, Van Gestel CAM, Van Schooten FJ, Murk AJ.** Risk assessment of metals and organic pollutants for herbivorous and carnivorous small mammal food chains in a polluted floodplain (Biesbosch, The Netherlands). *Environmental Pollution* 2006;144:581-595.
- Hart JW e Hartley-Asp B.** Induction of micronuclei in the mouse. *Mutation Reaserch* 1983;120(2-3):127-32.
- Hartwig A, Schwerdtle T.** Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicology Letters* 2002;127:47-54.
- Hassanain MA, Abdel-Rahman EH, Abo-Hegab S, Tawfik MAA, Abbas WT.** Induction of Cytochrome P450 1A1 as a biomarker of Benzo-a-pyrene Pollution in Egyptian Fresh Water Fish. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 2007;10(8):1161-1169.
- Hayashi M.** In vivo Rodent Micronucleus Assay. *Chromossomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health.* Gunter Obe and Vijayalaxmi (Eds.) Spring-Verlag Berlin Heidelberg; 2007.
- Hayes AW.** Principles and Methods of Toxicology, 3^aed. New York: Raven Press, Ltd; 1994.
- Hegde MJ, Sujatha TV.** In-vivo genotoxicity of the alkaloid drug pilocarpine nitrate in bone marrow cells and male germ cells of mice. *Mutation Research* 1995;344:103-108.
- Hoffan DJ, Rattner BA, Scheunert F.** Environmental contaminants. In: Shore, RF, Rattner BA (Eds.) *Ecotoxicology of wild mammals. Ecotoxicology and Environmental Toxicology Series* John Wiley and Sons, Ltd, Chichester; 2001. p. 1-48.



- Holdgate MW.** A perspective on Environmental Pollution. Cambridge University Press, Cambridge; 1975.
- Hukkanen J, Vaisanen T, Lassila A, Pipari R.** Regulation of CYP3A5 by Glucocorticoids and cigarette smoke in Human Lung-Derived Cells. The journal of pharmacology and experimental therapeutics 2003;304(2).
- Hunter BA, Johnson MS, Thompson DJ.** Ecotoxicology of copper and cadmium in contaminated grassland ecosystems. Journal of Applied Ecology 1987;24:601-614.
- Iarmarcovai G, Bonassi S, Botta A, Baan RA, Orsière T.** Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. Mutation Research 2008;658:215-233.
- Iarmarcovai G, Sari-Minodier I, Orsière T, Méo MD, Gallice P, Bideau C, Iniesta D, Pompili J.** A combined analysis of XRCC1, XRCC3, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and centromere content of micronuclei in welders. Mutagenesis 2006;21(2):159-165.
- Ieradi LA, Cristaldi M, Mascanzoni D, Cardarelli E, Grossi R, Campanella L.** Genetic damage in urban mice exposed to traffic pollution. Environmental Pollution 1996;92:323–328.
- Ieradi LA, Mascanzoni D, Mattei T.** Environmental impact of the Chernobyl accident: mutagenesis in Bank voles from Sweden. International Journal of Radiation Biology 1991;59(1):31-40.
- Ieradi LA, Moreno S, Bolívar JP, Cappai A, Di Benedetto A.** Free-living rodents as bioindicators of genetic risk in natural protected areas. Environmental Pollution 1998;102:265-268.
- International Agency for Research on Cancer (IARC).** Summaries & Evaluations Arsenic and Arsenic Compounds 1980;23:39.
- International Labour Organization.** International Occupational Safety and Health Information Centre 1999. Versão Online no site: <http://www.ilo.org/public>.
- Irigaray P, Newby JA, Clapp R, Hardell L, Howard V, Montagnier L, Epstein S, Belpomme D.** Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: An overview. Biomedicine & Pharmacotherapy 2007;61:640-658.
- Jadhav SH, Sarkar SN, Aggarwal M, Tripathi HC.** Induction of oxidative stress in erythrocytes of male rats subchronically exposed to a mixture of eight metals found as groundwater contaminants in different parts of India. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 2007;52:145–151.
- Jarup L.** Hazards of heavy metal contamination. British Medical Bulletin 2003;68:167-182.
- Johannesson M.** A review of risks associated to arsenic, cadmium, lead, mercury and zinc, p. 62. Appendix A in Johannesson, M. (Ed.) et al. 2002, The Market Implication of Integrated



- Management for Heavy Metals Flows for Bioenergy use in the European Union, Kalmar University, Department of Biology and Environmental Science, Sweden; 2002. p. 115.
- Johnsen RA, Lipthay JR, Christensen P.** Microbial degradation of street dust polycyclic aromatic hydrocarbons in microcosms simulating diffuse pollution of urban soil. *Environmental Microbiology* 2006;8(3):535-545.
- Kakkar P, Jaffery FN.** Biological markers for metal toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2005;19:335-349.
- Karmakar R, Chatterjee M.** Cadmium-induced time-dependent oxidative stress in liver of mice: a correlation with kidney. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 1998;6:201-207.
- Krivobok S, Kuony S, Meyer C, Louwagie M.** Identification of Pyrene-Induced Proteins in *Mycobacterium* sp. Strain 6PY1: Evidence for two Ring-Hydroxylating Dioxygenases. *Journal of Bacteriology* 2003;3828:3840.
- Laffon B, Fraga-Iriso R, Cadahía-Pérez B, Méndez J.** Genotoxicity associated to exposure to Prestige oil during autopsies and cleaning of oil-contaminated birds. *Food and chemical Toxicology* 2006;44:1714-1723.
- Lahdetie J, West A, Suutari A.** Detection of germ cell mutagenicity of trophosphamide by the spermatid micronucleus test in the rat. *Mutagenesis* 1995;10(4):287-290.
- Lasfer M, Vadrot N, Aoudjehane L, Bringuier AF, Feldmann G, Reyl-Desmars F.** Cadmium induces mitochondria-dependent apoptosis of normal human hepatocytes. *Cell Biology & Toxicology* 2008;24:55–62.
- Legator MS.** Chronology of studies regarding toxicity of 1-2-dibromo-3-Chloropropane. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1979;329:331-338.
- Li G, Sang N, Guo D.** Oxidative damage induced in hearts, kidneys and spleens of mice by landfill leachate. *Chemosphere* 2006;65:1058–1063.
- Liro A.** Variation in weights of body and internal organs of the field mouse in a gradient of urban habitats. *Acta Theriol.* 1985;30:359–377.
- Lopes P, Viegas-Crespo A, Nunes A, Pinheiro T, Marques C, Santos M, Mathias, M.** Influence of age, sex and sexual activity on trace element levels and antioxidant enzyme activities in field mice (*Apodemus sylvaticus* and *Mus spretus*). *Biological Trace Element Research* 2002;85:277-239.
- Ma WC, Talmage SS.** Insectivora. In: Shore RF, Rattner BA (Eds.). *Ecotoxicology of Wild Mammals*, Ecotoxicological & Environmental Toxicology Series. John Wiley and Sons Ltd., New York; 2001. p. 123–158.



- Ma WC.** Effects of soil pollution with metallic pellets on lead bioaccumulation and organ/body weight alterations in small mammals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 1989;18:617-622.
- Macdonald D, Barret P.** Mamíferos de Portugal e Europa. Fapas – Fundo para a protecção dos animais selvagens; 1993. p.240.
- Manca D, Ricard AC, Trottier B, Chevalier G.** Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride. *Toxicology* 1991;67:303–323.
- Marques CC, Sánchez-Chardi A, Gabriel SI, Nadal J, Viegas-Crespo AM, Mathias ML.** How does the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*, responds to long term heavy metal contamination? A case study. *Science of the Total Environment* 2007;376:128-133.
- Materiy LD, Maslova KI.** Micronuclei in peripheral blood cells of *Microtus oeconomus* Pall. living in areas of enhanced natural radioactivity. *Radiobiologiya* 1978;18:919-922.
- McBee K, Bickham JW.** Petrol-chemical related DNA damage in wild rodents detected by flow cytometry. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 1988;40:343-349.
- Medina MH, Correa JA, Barata C.** Micro-evolution due to pollution: Possible consequences for ecosystem responses to toxic stress. *Chemosphere* 2007;67:2105-2114.
- Mejia JJ, Carrizales L, Rodriguez VM, Jimenez-Capdeville ME, Díaz-Barriga F.** Un metodo para la evaluacion de riesgo para la salud en zonas mineras. *Salud Publica Mexico* 1999;41:132-140.
- Metcheva R, Teodorova S, Topashka-Ancheva M.** A comparative analysis of the heavy metal loading of small mammals in different regions of Bulgaria I: monitoring points and bioaccumulation features. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2003;54:176-187.
- Mielzynska D, Siwinska E, Kapka L.** The influence of environmental exposure to complex mixtures including PAHs and lead on genotoxic effects in children living in Upper Silesia. *Poland Mutagenesis* 2006;21(5):295-304.
- Milton A, Cooke JA, Johnson MS.** Accumulation of lead, zinc, and cadmium in a wild population of *Clethrionomys glareolus* from an abandoned lead mine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 2003;44:405–411.
- Minissi S, Lombi E.** Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. *Mutation Research* 1997;39:317-321.
- Moorthy B, Miller KP, Jiang W, Williams ES.** Role of Cytochrome P4501B1 in Benzo[a]pyrene bioactivation to DNA-binding metabolites for formation of 3-Hydroxybenzo[a]pyrene and Benzo[a]pyrene-3,6-quinone as Major Proximate Genotoxic Intermediates. *Journal of Pharmacology and experimental therapeutics* 2003;305:394-401.



- Moraes DSL, Jordão BQ, Oliveira MD, Eilers V.** Investigação da actividade mutagénica de efluentes municipais pelo teste de Allium. Resumos do 48º Congresso Nacional de Genética; 2002.
- Morse DL, Harrington JM, Housworth J, Landrigan PJ.** Arsenic exposure in multiple environmental media in children near a smelter. *Clinical Toxicology* 1979;14:389–399.
- Mudipalli A.** Lead hepatotoxicity & potential health effects. *Indian Journal Medical Research* 2007;126:518-527.
- Nakachi K, Imai K.** Polymorphisms of the CYP1A1 and Glutathione S-Transferase Genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in a Japanese population. *Cancer Research* 1993;53:2994-2999.
- National Research Council.** Animals as sentinels of environmental health hazards, 1st edition, national Academy Press, Washington DC, USA; 1991.
- Nerbert DW, Dalton TP.** The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nature reviews Cancer* 2006;6(12):947-960.
- Nimis PL.** Air quality indicators and indices: the use of plants as bioindicators for monitoring air pollution. In: Colombo, A.G. e Premazzi, G. (Eds.); 1990. p.93-126.
- Nordberg GF, Onawa K, Nordberg M, Friberg LT.** Cadmium, In: Nordberg, G.F., Fowler, B.A., Nordberg, M., Friberg, L. (Eds.), *Handbook of Toxicology of Metals*, 3rd ed. Elsevier Publishers, Amsterdam; 2007.
- Nriagu JO, Pacyna JM.** Quantitative assessment of world-wide contamination of air, water, and soils by trace metals. *Nature* 1988;333:134–139.
- Nunes AC, Mathias MC, Crespo AM.** Morphological and haematological parameters in the Algerian mouse (*Mus spretus*) inhabiting an area contaminated with heavy metals. *Environmental Pollution* 2001; 133:87-93.
- ONU.** United Nations Synthesis Report on Arsenic in Drinking Water. In: Smedley PL, Kinniburgh DG (Eds). *Source and Behavior of Arsenic in Natural Waters* (Chapter1); 2001.
- Palus J, Rydzynski K, Dziubaltowska E, Wyszynska K, Natarajan AT, Nilsson R.** Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutation Research* 2003;540:19–28.
- Pandey KM, Pant AB, Das M.** In vitro cytotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon residues arising through repeated Wsh fried oil in human hepatoma Hep G2 cell line. *Toxicology in Vitro* 2006;20:308-316.
- Pankakoski E, Hyvarinen H, Jalkanen M, Koivisto I.** Accumulation of heavy metals in the mole in Finland. *Environmental Pollution*. 1993;80:9–16.



- Pankakoski E, Koivisto I, Hyvarinen H, Terhivuo J.** Shrews as indicators of heavy metal pollution. Carnegie Museum of Natural History Special Publication 1994;18:137–149.
- Paradisi S, Caronna E, Ieradi LA.** First application of the transplacental micronucleus test in wild rodents. Atti Soc. Ital. Sci. Nat. Museo Civ. Stor. Nat. Milano 1986;127:245-252.
- Parrish ZD, White CJ, Mattina, MI.** Accumulation of weathered polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by plant and earthworm species. Chemosphere 2006;64:609-618.
- Pascalichio AE.** Contaminação por metais pesados. Annablume 2002. p.132
- Pavanello S, Clonfero E.** Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. Mutation Research 2004;63:285-308.
- Peakall DB, McBee K.** Biomarkers for contaminant exposure and effects in mammals, In: Ecotoxicology of wild mammals. Eds. R.F. Shore e B.A. Rattner, John Wiley and Sons Ltd; 2001.
- Pereira R, Pereira ML, Ribeiro R, Goncalves F.** Tissues and, hair residues and histopathology in wild rats (*Rattus rattus L.*) and Algerian mice (*Mus spretus Lataste*) from an abandoned mine area (Southeast Portugal). Environmental Pollution 2006;139:561–575.
- Perreault SD, Cancel AM.** Significance of incorporating measures of sperm production and function into rat toxicology studies. Reproduction 2001;121:207-216.
- Phillips KP e Tanphaichitr N.** Human Exposure to Endocrine Disrupters and Semen Quality, Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, 2008;11:188-220.
- Platt KL.** Microsomal Biotransformation of Benzo[ghi]perylene, a mutagenic PAH without a “Classic” bay region. Chemical Research Toxicology 2005;18:700-710.
- Pritchard, JB.** Aquatic toxicology: past, present and prospects. Environmental health perspectives 1993;100:249-257.
- Puckett KJ.** Bryophytes and lichens as biomonitors of metal deposition. Lichenol 1998;30:231-268.
- Pyatskowitz J, Prohaska JR.** Copper deficient rats and mice both develop anemia but only rats have lower plasma and brain iron levels. Comparative Biochemistry and Physiology 2008;147:316-323.
- Ramalhinho MG, Mathias ML.** Mamíferos terrestres de Portugal continental, Açores e Madeira. Instituto da conservação da natureza centro de biologia ambiental da universidade de Lisboa; 1999. p.60.
- Reynolds KD, Schwarz MS, McFarland CA, McBride T, Adair B, Strauss RE, Cobb GP, Hooper MJ, McMurry ST.** Northern pocket gophers (*Thomomys talpoides*) as biomonitors of environmental metal contamination. Environmental Toxicology and Chemistry 2006;25:458–469.



- Ribeiro H, Assunção VJ.** Efeitos das queimadas na saúde humana. *Estudos Avançados* 2002;16 (44).
- Rogival D, Scheirs J, Blust R.** Transfer and accumulation of metals in a soil–diet–wood mouse food chain along a metal pollution gradient. *Environmental Pollution* 2007;145:516–528.
- Ruíz-Laguna J, Garcia-Alfonso C, Peinado J, Moreno S, Ieradi LA, Cristaldi M, López-Barea J.** Biochemical biomarkers of pollution in Algerian mouse (*Mus spretus*) to assess the effects of the Aznalcóllar disaster on Doñana Park (Spain). *Biomarkers* 2001;6(2).
- Saadat M, Bahaoddini A.** Hematological changes due to chronic exposure to natural gas leakage in polluted areas of Masjid-i-Sulaiman (Khozestan province, Iran). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2004;58:273-276.
- Samanta SK, Singh OV, Jain RK.** Polycyclic aromatic hydrocarbons environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology* 2002;20:243-248.
- Sánchez-Chardi A, Marques C, Gabriel SI, Capela-Silva F, Cabrita AS, López-Fuster MJ, Nadal J, e Mathias ML.** Haematology, genotoxicity, enzymatic activity and histopathology as biomarkers of metal pollution in the shrew *Crocidura russula*. *Environmental Pollution* 2008;156:1332–1339.
- Sánchez-Chardi A, Marques CC, Nadal J, Mathias ML.** Metal bioaccumulation in the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*, inhabiting an abandoned pyrite mine site. *Chemosphere* 2007;67:121–130.
- Sánchez-Chardi A, Nadal J.** Bioaccumulation of metals and effects of a landfill in small mammals. Part I. The greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*. *Chemosphere* 2007;68:703–711.
- Scheirs J, De Coen A, Covaci A, Beernaert J, Kayawe VM, Caturla M, De Wolf H, Baert P, Van Oostveldt P, Verhagen R, Blust R, De Coen W.** Genotoxicity in wood mice (*Apodemus sylvaticus*) along a pollution gradient: exposure-, age-, and gender- related effects. *Environmental Toxicology & Chemistry* 2006;25:2154–2162.
- Schmid W.** The micronucleus test. *Mutation Research* 1975;31(1):9-15.
- Schoket B, Papp G, Lévy K.** Impact of metabolic genotypes on levels of biomarkers of genotoxic exposure. *Mutation Research* 2001;482:57-69.
- Seosane AI, Dulout FN.** Genotoxic ability of cadmium, chromium and nickel salts studied by kinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay. *Mutation Research* 2001;490:99–106.
- Sheffield SR, Sawicka-Kapusta K, Cohen JB, Rattner BA.** In: Shore, R.F., Rattner, B.A. (Eds.). *Rodentia And Lagomorpha. Ecotoxicology of Wild Mammals. Ecological & Environmental Toxicology series.* John Wiley and Sons LTD, New York; 2001. p. 215–314.



- Shore RF e Rattner BA.** Ecotoxicology of wild mammals. John Wiley and Sons Ltd; 2001.
- Silbergeld EK.** Facilitate mechanisms of lead as a carcinogen. *Mutation Research* 2003;533:121-133.
- Silva J, Fonseca MB.** Estudos Toxicológicos no Ambiente e na Saúde Humana. *Genética Toxicológica* 2003. p.70-84.
- Simmonds PL, Luckhurst CL, Woods JS.** Quantitative evaluation of heme biosynthetic pathway parameters as biomarkers of low-level lead exposure in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 1994;44:351-367.
- Smith AH, Lingas EO, Rahman M.** Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. *Bull. WHO* 2000;78:1093–1103.
- Smith D, Bayer L, Strupp BJ.** Efficacy of succimer chelation for reducing brain Pb level in a rodent model. *Environmental Research* 1998;78:168-176.
- Squadrito GL, Cueto R, Dellinger B.** Quinoid redox study. *Lancet* 2001;360:1203-1209.
- Stansley W, Roscoe DE.** The uptake and effects of lead in small mammals and frogs at a trap and skeet range. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 1996;30:220–226.
- Stephanou G, Russo A, Vlastos D.** Micronucleus induction in somatic cells of mice as evaluated after 1,3-butadiene inhalation. *Mutation Research* 1998;397:11-20.
- Talmage SS e Walton BT.** Small mammals as monitors of environmental contaminants..., *Environmental Contamination and Toxicology* 1991;119:47-145.
- Tanzarella C, Degrassi F, Cristaldi M, Moreno S, Lascialfari A, Chiuchiarelli G, Ieradi LA.** Genotoxic damage in free-living algerian mouse (*Mus spretus*) after the Coto Donana ecological disaster. *Environmental Pollution* 2001;115:43-48.
- Tapisso JT, Marques CC, Mathias ML, Ramalhinho MG.** Induction of micronuclei and sister chromatid exchange in bone-marrow cells and abnormalities in sperm of Algerian mice (*Mus spretus*) exposed to cadmium, lead and zinc. *Mutation Research* 2009;678:59–64.
- Tavares TM.** Avaliação de exposição de populações humana a metais pesados no ambiente: Exemplos do Recôncavo Baiano. *Química Nova* 1992;15(2):147-154.
- Tersago K, De Coen W, Scheirs J, Vermeulen K, Blust R, Van Bockstaele D, Verhagen, R.** Immunotoxicology in wood mice along a heavy metal pollution gradient. *Environmental Pollution* 2004;132:385–394.
- Tewari PC, Kachru DN, Tandon SK.** Influence of copper and iron on subacute cadmium intoxication in protein-malnourished rats. *Environmental Research* 1986;41(1):53-60.
- Topashka-Ancheva M, Metcheva R, Teodorova S.** A comparative analysis of the heavy metal loading of small mammals in different regions of Bulgaria II: chromosomal aberrations and blood pathology. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2003;45:188-193.



- Torres J, Peig J, Eira C, Borrás M.** Cadmium and lead concentrations in *Skrjabinotaenia lobata* (Cestoda: Catenotaeniidae) and in its host, *Apodemus sylvaticus* (Rodentia: Muridae) in the urban dumping site of Garraf (Spain). *Environmental Pollution* 2006;143:4–8.
- Tull-Singleton S, Kimball S, McBee K.** Correlative analysis of heavy metal bioconcentration and genetic damage in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) from hazardous waste site. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 1994;52:667-672.
- Umbuzeiro GA, Roubicek DA, Stoppe NC.** Caracterização de amostras de sedimentos hídricos do estuário de Santos utilizando análises de toxicidade aguda e genotoxicidade de bactérias dos ciclos biogeoquímicos. *O mundo de saúde* 2004;28(4):436-443.
- Vakharia DD, Liu NL, Pause R, Fasco M, Bessette QZ, Kaminsky LS.** Effect of metals on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon induction of CYP1A1 and CYP1A2 in human hepatocyte cultures. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2001;170:93-103.
- Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC.** Principles of Laboratory Animal Science, revised ed. Elsevier, Amesterdão; 2006.
- Viegas-Crespo AM e Reis MA.** Efeitos da Poluição Ambiental nos Anfíbios. *Câmara Comercio & Industria de Careceres* 1999;71:267-288.
- Viegas-Crespo AM, Lopes PA, Pinheiro MT, Santos MC, Rodrigues PD, Nunes AC, Marques C, Mathias ML.** Hepatic elemental contents and antioxidant enzyme activities in algerian mice (*Mus spretus*) inhabiting a mine area in central Portugal. *The Science of Total Environmental* 2003;311:101-109.
- Wlóstowski T, Krasowska A, Bonda E.** An iron-rich diet protects the liver and kidneys against cadmium-induced injury in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2003;54:194–198.
- Wang G, Fowler BA.** Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. *Toxicology and Applied Pharmacology* (in press); 2008.
- Wang XL, Greco M, Sim AS, Duarte N, Wang J, Wilcken DEL.** Effect of CYP1A1 *MspI* polymorphism on cigarette smoking related coronary artery disease and diabetes. *Atherosclerosis* 2002;162:391-397.
- Waterstone et al.** Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 2002;420:520-562.
- Wey MY, Chen JC.** Formations and controls of HCL and PAHs by different additives during waste incineration. *Fuel* 2006;85:755-763.
- Whorton D, Milby TH, Krauss RM.** Testicular function in dbcp exposed pesticide workers. *Journal of Occupational Medicine* 1979;21:161-166.



- World Health Organization (WHO).** Polynuclear aromatic hydrocarbons in drinking-water. Background document for preparation of WHO. Guidelines for drinking-water quality. Geneva; 2003.
- Wyrobek A, Bruce W.** Chemical induction of sperm abnormalities in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 1975;72:4425-4429.
- Xu X, Kelsey KT, Wiencke JK, Wain JC, Christiani DC.** Cytochrome P450 CYP1A1 *Msp I* polymorphism and lung cancer susceptibility. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 1996;5:687-692.
- Yang W, Omaye ST.** Air Pollutants, Oxidative Stress and Human Health. Mutation Research 2009;674:45-54.
- Yu M-W, Chiu Y-H, Santella RM.** Cytochrome P450 1A1 genetic polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers. British journal of Cancer 1999;80:598-603.
- Yu RA, He LF, Chen XM.** Effects of cadmium on hepatocellular DNA damage, proto-oncogene expression and apoptosis in rats. Biomedical Environmental Sciences 2007;20:146–153.
- Zanobetti A, Schwartz J, Samoli E.** The temporal pattern of respiratory and heart disease mortality in response to air pollution. Environmental Health Perspective 2003;111(9):1188-1193.



QUADRO 1. Dados morfológicos dos animais

Nº do Ratinho	Local	Espécie	Sexo	Comprimento (mm)	Peso (g)	Peso Fígado (g)	Peso Relativo Fígado (mg)	Peso Rim E. (g)	Peso Rim D. (g)	Peso Relativo Rim E. (mg)	Peso Relativo Rim D. (mg)
56	GR	MM	F	86	17,96	-	-	-	-	-	-
57	GR	MM	F	79	14,823	-	-	-	-	-	-
59	GR	MM	F	86	18,158	-	-	-	-	-	-
60	GR	MM	F	91	17,847	-	-	-	-	-	-
61	GR	MM	F	91	17,72	-	-	-	-	-	-
62	GR	MM	M	92	19,768	-	-	-	-	-	-
2	ZF	MM	M	89	12,12	1,0263	84,68	0,13	0,14	10,71	11,15
4	ZF	MM	M	83	15,47	0,862	55,72	0,11	0,12	6,88	7,69
5	ZF	MM	M	83	16,146	0,9401	58,22	0,15	0,15	9,05	9,27
12	ZF	MM	M	83	15,02	0,859	57,19	0,11	0,12	7,56	7,68
13	ZF	MM	M	81	15,304	0,8605	56,23	0,12	0,13	7,71	8,18
15	ZF	MM	M	82	12,861	0,666	51,78	0,09	0,10	7,04	7,41
20	ZF	MM	F	84	14,033	0,787	56,08	0,13	0,14	9,11	9,74
21	ZF	MM	F	69	10,762	0,6147	57,12	0,07	0,07	6,46	6,64
22	ZF	MM	M	85	16,223	0,8176	50,40	0,13	0,13	7,73	8,32
23	ZF	MM	F	88	18,428	1,121	60,83	0,14	0,15	7,81	8,13
24	ZF	MM	F	87	18,7	1,403	75,03	0,10	0,10	5,39	5,59
41	ZU	MM	M	93	18,558	0,6795	36,61	0,15	0,17	7,98	9,01
42	ZU	MM	F	71	11,723	0,5234	44,65	0,08	0,09	6,73	7,36
43	ZU	MM	F	82	14,758	0,9304	63,04	0,12	0,12	8,04	8,16
44	ZU	MM	M	72	12,538	0,8032	64,06	0,09	0,10	7,54	8,14
45	ZU	MM	F	79	12,435	0,7757	62,38	0,09	0,10	7,49	8,03
46	ZU	MM	F	85	13,235	0,724	54,70	0,13	0,12	9,57	8,86
47	ZU	MM	F	75	12,847	0,9004	70,09	0,09	0,10	7,23	7,49
1	ZI	MM	F	80	11,678	0,56	47,95	0,07	0,09	5,94	7,71
6	ZI	MM	F	76	12,508	0,982	78,51	0,11	0,11	8,58	8,64
7	ZI	MM	F	81	16,167	0,914	56,53	0,09	0,09	5,36	5,60
8	ZI	MM	F	78	12,908	0,882	68,33	0,08	0,08	6,07	6,04
9	ZI	MM	M	84	14,795	1,393	94,15	0,10	0,10	6,84	6,98
10	ZI	MM	M	87	16,634	1,263	75,93	0,13	0,12	7,69	7,30
11	ZI	MM	F	78	12,111	0,7412	61,20	0,10	0,10	7,93	8,15
14	ZI	MM	M	71	8,4229	0,6221	73,86	0,06	0,07	7,49	8,00
16	ZI	MM	M	81	14,655	0,9824	67,04	0,11	0,11	7,29	7,39
17	ZI	MM	F	77	11,878	0,5521	46,48	0,08	0,09	6,57	7,19
31	ZI	MM	F	75	11,519	0,983	85,34	0,08	0,09	7,27	8,04
32	ZI	MM	M	77	13,47	0,852	63,25	0,09	0,10	7,03	7,40
33	ZI	MM	M	71	10,408	0,7294	70,08	0,07	0,07	7,06	6,92
34	ZI	MM	M	78	12,763	1,034	81,02	0,11	0,10	8,83	8,10
35	ZI	MM	F	65	10,21	0,6743	66,04	0,06	0,07	6,24	6,66
36	ZI	MM	F	67	8,34	0,742	88,97	0,06	0,06	7,18	7,31
37	ZI	MM	M	78	15,17	0,9137	60,23	0,09	0,09	6,04	6,17
38	ZI	MM	M	88	15,85	1,284	81,01	0,11	0,11	7,05	7,10
39	ZI	MM	F	77	13,484	1,228	91,07	0,11	0,11	8,35	8,11
40	ZI	MM	M	75	10,98	0,7275	66,26	0,08	0,09	7,13	7,74

GR, grupo de referência; ZF, zona florestal; ZU, zona urbana; ZI, zona industrial; MM, *Mus musculus*.



QUADRO 2. Valores dos parâmetros hematológicos analisados para os diferentes animais

Nº do Ratinho	Local	Espécie	Sexo	RBC	WBC	Hgb	HCT
2	ZF	MM	M	8,36	4,16	12,5	39,1
4	ZF	MM	M	7,78	8,54	12,3	38
5	ZF	MM	M	7,48	5	11,2	35,6
12	ZF	MM	M	9,58	1,1	14,5	47,5
13	ZF	MM	M	4,86	1,9	14,8	36,3
15	ZF	MM	M	11,13	1,8	16,5	52,9
20	ZF	MM	F	10,87	3,1	16,8	55,3
21	ZF	MM	F	8,62	10,8	12,1	40
22	ZF	MM	M	7,38	12,73	11,3	41,5
23	ZF	MM	F	8,19	3,2	11,5	40,6
24	ZF	MM	F	4,63	1	6,6	22,3
41	ZU	MM	M	7,82	0,9	10,8	37,7
42	ZU	MM	F	3,07	1,9	4,3	16
43	ZU	MM	F	5,23	2	8,1	27
44	ZU	MM	M	6,01	3,2	7,2	27,3
45	ZU	MM	F	5,22	0,9	7,5	28,7
46	ZU	MM	F	4,55	0,2	5,5	21,1
47	ZU	MM	F	4,69	8,5	5,5	21,3
1	ZI	MM	F	8,06	4,3	13	40,8
6	ZI	MM	F	3,23	5,4	8,56	30
7	ZI	MM	F	9,66	8,25	13,5	43,3
8	ZI	MM	F	10,08	5,1	13,7	44,7
9	ZI	MM	M	6,93	6,5	8,9	29,7
10	ZI	MM	M	4,1	2,8	7,61	33
11	ZI	MM	F	0,39	4,4	8,3	5,2
14	ZI	MM	M	7,97	4,5	11,3	36,5
16	ZI	MM	M	7,34	8,8	13,6	37,9
17	ZI	MM	F	10,2	6,4	13,6	44,5
31	ZI	MM	F	8,3	2,4	10,8	36
32	ZI	MM	M	10,5	1,7	14,6	47,9
33	ZI	MM	M	8,86	1,9	12,4	40,6
34	ZI	MM	M	7,34	2,2	10,5	34,8
35	ZI	MM	F	5,42	0,7	8,1	25,7
36	ZI	MM	F	6,74	4	10,5	33,9
37	ZI	MM	M	5,95	1,9	8,8	29
38	ZI	MM	M	9,64	3,2	12,8	43,2
39	ZI	MM	F	5,22	0,8	7,4	25
40	ZI	MM	M	4,76	1,5	6,8	22,9

GR, grupo de referência; ZF, zona florestal; ZU, zona urbana; ZI, zona industrial; MM, *Mus musculus* WBC ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$), glóbulos brancos; RBC ($\times 10^6 \text{ mm}^{-3}$), glóbulos vermelhos; Hgb (g/dl), concentração de hemoglobina; HCT (%), hematócrito.

QUADRO 3. Contagem individual do número de micronúcleos em 1000 eritrócitos policromáticos analisados

Nº Ratinho	Local	Sexo	MNECP
2	Zona Florestal	M	2
4	Zona Florestal	M	2
5	Zona Florestal	M	1
12	Zona Florestal	M	1
13	Zona Florestal	M	0
15	Zona Florestal	M	0
20	Zona Florestal	F	1
21	Zona Florestal	F	0
22	Zona Florestal	M	0
23	Zona Florestal	F	1
24	Zona Florestal	F	0
41	Zona Urbana	M	6
42	Zona Urbana	F	5
43	Zona Urbana	F	4
44	Zona Urbana	M	1
45	Zona Urbana	F	2
46	Zona Urbana	F	1
47	Zona Urbana	F	3
1	Zona Industrial	F	3
6	Zona Industrial	F	9
7	Zona Industrial	F	8
8	Zona Industrial	F	7
9	Zona Industrial	M	5
10	Zona Industrial	M	8
11	Zona Industrial	F	10
14	Zona Industrial	M	15
16	Zona Industrial	M	9
17	Zona Industrial	F	12
31	Zona Industrial	F	10
32	Zona Industrial	M	3
33	Zona Industrial	M	7
34	Zona Industrial	M	-
35	Zona Industrial	F	17
36	Zona Industrial	F	4
37	Zona Industrial	M	-
38	Zona Industrial	M	10
39	Zona Industrial	F	-
40	Zona Industrial	M	-

MNEPC, frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados.



QUADRO 4. Valores dos metais pesados encontrados no fígado dos animais por espectrofotometria de absorção atômica em forno de grafite e por chama

GRAFITE	Nº RATINHO	GRUPO DE REFERÊNCIA					ZONA FLORESTAL – QUINTA DA APOSTICA										ZONA URBANA – QUINTA DO DR. ELVAS								
		56	57	59	60	61	62	2	4	5	12	13	15	20	21	22	23	24	41	42	43	44	45	46	47
Ni																									
Peso Seco (g)		0,12	0,10	0,17	0,12	0,15	0,16	0,14	0,14	0,14	0,12	0,12	0,10	0,11	0,09	0,13	0,20	0,22	0,14	0,09	0,19	0,16	0,14	0,12	0,14
Volume inicial (ml)		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Concentração (µg/l)		0,66	0,59	0,59	0,78	0,91	0,77	0,70	0,59	0,49	0,78	1,05	0,73	0,79	0,88	1,11	0,30	0,40	1,55	0,97	0,79	0,70	0,64	0,63	0,71
Conc. Final (µg/g)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,51	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,38	0,00	0,00	0,00	6,84	0,00	0,00	19,28	3,77	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Cd																									
Peso Seco (g)		0,12	0,10	0,17	0,12	0,15	0,16	0,14	0,14	0,14	0,12	0,12	0,10	0,11	0,09	0,13	0,20	0,22	0,14	0,09	0,19	0,16	0,14	0,12	0,14
Volume inicial (ml)		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Concentração (µg/l)		0,00	0,03	0,10	0,03	0,06	0,06	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	1,08	0,21	0,13	0,35	0,00	0,21	0,08	0,00	0,23	3,13	0,00	0,12	0,13
Conc. Final (µg/g)		0,00	1,21	2,37	0,94	1,65	1,42	0,00	0,25	0,00	0,00	0,00	45,6	7,68	5,68	11,0	0,00	3,80	2,43	0,00	4,97	80,5	0,00	4,04	3,56
Pb																									
Peso Seco (g)		0,12	0,10	0,17	0,12	0,15	0,16	0,14	0,14	0,14	0,12	0,12	0,10	0,11	0,09	0,13	0,20	0,22	0,14	0,09	0,19	0,16	0,14	0,12	0,14
Volume inicial (ml)		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Concentração (µg/l)		1,83	1,65	0,00	0,27	0,28	0,30	3,46	2,72	4,78	4,35	1,28	2,13	1,83	1,98	2,37	0,24	2,82	4,81	2,66	5,50	2,19	2,65	1,45	0,78
Conc. Final (µg/g)		61,8	68,8	0,00	8,9	7,5	7,6	96,3	75,7	140	142	43,1	83,9	68,1	83,7	74,2	4,9	51,3	141	123	119	56,3	77,4	47,8	22,1
Cr																									
Peso Seco (g)		0,12	0,10	0,17	0,12	0,15	0,16	0,14	0,14	0,14	0,12	0,12	0,10	0,11	0,09	0,13	0,20	0,22	0,14	0,09	0,19	0,16	0,14	0,12	0,14
Volume inicial (ml)		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Concentração (µg/l)		0,84	0,31	0,48	0,53	0,35	0,32	1,26	1,64	1,28	0,70	1,02	0,78	1,39	0,76	6,58	1,89	1,06	7,45	0,53	1,61	0,60	0,66	0,59	0,48
Conc. Final (µg/g)		28,3	13,0	11,2	17,1	9,5	8,0	35,0	45,5	37,3	22,8	34,4	30,6	51,5	32,4	206	38,7	19,3	218	24,2	34,8	15,3	19,2	19,3	13,5
CHAMA																									
Hg																									
Peso Seco (g)		0,12	0,10	0,17	0,12	0,15	0,16	0,14	0,14	0,14	0,12	0,12	0,10	0,11	0,09	0,13	0,20	0,22	0,14	0,09	0,19	0,16	0,14	0,12	0,14
Volume inicial (ml)		1,7	1,65	1,64	1,75	1,4	1,55	1,5	1,5	1,55	1,4	1,58	1,55	1,54	1,42	1,7	1,67	1,5	1,4	1,4	1,6	1,77	1,57	1,55	1,35
Concentração (mg/l)		0,05	0,05	0,01	0,15	0,14	0,30	0,23	0,13	0,29	0,29	0,42	-	0,28	-	0,72	0,42	0,31	0,18	0,23	0,56	0,98	0,13	0,52	0,19
Conc. Final (mg/g)		0,72	0,86	0,10	2,13	1,33	2,94	2,40	1,36	3,28	3,31	5,58	-	4,00	-	9,56	3,58	2,11	1,84	3,71	4,84	11,2	1,49	6,62	1,83
Cu																									
Peso Seco (g)		0,12	0,10	0,17	0,12	0,15	0,16	0,14	0,14	0,14	0,12	0,12	0,10	0,11	0,09	0,13	0,20	0,22	0,14	0,09	0,19	0,16	0,14	0,12	0,14
Volume inicial (ml)		1,7	1,65	1,64	1,75	1,4	1,55	1,5	1,5	1,55	1,4	1,58	1,55	1,54	1,42	1,7	1,67	1,5	1,4	1,4	1,6	1,77	1,57	1,55	1,35
Concentração (mg/l)		0,14	0,12	0,22	0,15	0,14	0,17	0,15	0,17	0,18	0,09	0,15	0,12	0,10	0,08	0,20	0,25	0,20	0,24	0,13	0,22	0,24	0,23	0,16	0,11
Conc. Final (mg/g)		2,01	2,00	2,12	2,19	1,31	1,63	1,56	1,82	2,08	1,07	1,00	1,77	1,49	1,20	2,67	2,12	1,39	2,41	2,11	1,90	2,67	2,64	2,09	1,10
Zn																									
Peso Seco (g)		0,12	0,10	0,17	0,12	0,15	0,16	0,14	0,14	0,14	0,12	0,12	0,10	0,11	0,09	0,13	0,20	0,22	0,14	0,09	0,19	0,16	0,14	0,12	0,14
Volume inicial (ml)		1,7	1,65	1,64	1,75	1,4	1,55	1,5	1,5	1,55	1,4	1,58	1,55	1,54	1,42	1,7	1,67	1,5	1,4	1,4	1,6	1,77	1,57	1,55	1,35
Concentração (mg/l)		0,63	0,59	1,14	0,70	0,60	0,72	0,74	0,88	0,80	0,53	0,82	0,49	0,65	0,48	1,30	1,58	1,23	0,73	0,51	1,23	1,06	1,20	0,84	0,54
Conc. Final (mg/g)		9,02	10,1	10,8	9,95	5,69	7,04	7,68	9,18	9,07	6,01	10,8	7,53	9,27	7,22	17,3	13,4	8,36	7,52	8,17	10,7	12,0	13,7	10,7	5,23
Mn																									
Peso Seco (g)		0,12	0,10	0,17	0,12	0,15	0,16	0,14	0,14	0,14	0,12	0,12	0,10	0,11	0,09	0,13	0,20	0,22	0,14	0,09	0,19	0,16	0,14	0,12	0,14
Volume inicial (ml)		1,7	1,65	1,64	1,75	1,4	1,55	1,5	1,5	1,55	1,4	1,58	1,55	1,54	1,42	1,7	1,67	1,5	1,4	1,4	1,6	1,77	1,57	1,55	1,35
Concentração (mg/l)		0,04	0,02	0,05	0,03	0,02	0,02	0,04	0,05	0,05	0,02	0,04	0,03	0,03	0,02	0,03	0,06	0,07	0,03	0,01	0,05	0,07	0,03	0,05	0,03
Conc. Final (mg/g)		0,53	0,41	0,43	0,45	0,22	0,21	0,43	0,41	0,54	0,25	0,48	0,52	0,40	0,33	0,45	0,47	0,46	0,29	0,13	0,47	0,74	0,31	0,66	0,33
Concentração Final = (Concentração / Peso seco) x Volume inicial																									

Concentração Final = (Concentração / Peso seco) x Volume inicial

QUADRO 5. Valores dos metais pesados encontrados no fígado dos animais por espectrofotometria de absorção atômica em forno de grafite e por chama

ZONA INDUSTRIAL – SECA DO BACALHAU																					
Nº RATINHO		1	6	7	8	9	10	11	14	16	17	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
GRAFITE																					
Ni																					
Peso Seco (g)	0,07	0,15	0,12	0,11	0,11	0,22	0,17	0,11	0,08	0,12	0,08	0,17	0,15	0,10	0,20	0,11	0,11	0,16	0,20	0,22	0,13
Volume inicial (ml)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Concentração (µg/l)	0,89	0,39	0,68	0,47	0,95	0,96	0,96	0,86	0,97	0,70	1,01	1,36	0,79	1,40	0,87	1,05	0,83	0,67	0,77	1,21	
Conc. Final (µg/g)	0,17	0,00	0,00	0,00	1,10	1,65	0,00	0,00	3,99	0,00	6,12	10,8	0,00	19,9	0,00	5,70	0,00	0,00	0,00	9,47	
Cd																					
Peso Seco (g)	0,07	0,15	0,12	0,11	0,22	0,17	0,17	0,11	0,08	0,12	0,08	0,17	0,15	0,10	0,20	0,11	0,11	0,16	0,20	0,22	0,13
Volume inicial (ml)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Concentração (µg/l)	0,00	8,32	3,60	-	2,77	5,29	3,74	0,93	2,34	2,82	3,49	1,97	-	3,56	1,02	4,52	3,23	16,1	3,72	0,02	
Conc. Final (µg/g)	0,00	216	124	-	51,5	121	133	45,0	80,0	144	80,0	51,1	-	72,2	36,8	160	80,0	320	66,1	0,48	
Pb																					
Peso Seco (g)	0,07	0,15	0,12	0,11	0,22	0,17	0,17	0,11	0,08	0,12	0,08	0,17	0,15	0,10	0,20	0,11	0,11	0,16	0,20	0,22	0,13
Volume inicial (ml)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Concentração (µg/l)	1,18	1,00	1,59	1,19	0,56	1,23	0,01	1,03	1,79	1,89	1,58	1,58	1,37	0,00	0,20	0,31	0,49	0,91	1,13	0,95	1,29
Conc. Final (µg/g)	65,4	25,9	54,6	44,3	10,4	28,2	0,50	50,0	61,2	96,4	36,1	35,5	35,5	0,00	4,04	10,9	17,4	22,5	22,5	16,9	38,5
Cr																					
Peso Seco (g)	0,07	0,15	0,12	0,11	0,22	0,17	0,17	0,11	0,08	0,12	0,08	0,17	0,15	0,10	0,20	0,11	0,11	0,16	0,20	0,22	0,13
Volume inicial (ml)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Concentração (µg/l)	1,00	0,84	0,79	1,04	0,95	1,06	0,79	1,18	0,95	0,98	1,75	0,79	0,79	0,74	0,73	0,90	0,68	0,94	2,30	0,99	0,92
Conc. Final (µg/g)	55,0	21,8	27,2	38,7	17,7	24,3	28,3	57,3	32,4	49,9	40,0	20,6	20,6	28,4	14,8	32,2	24,0	23,2	45,7	17,6	27,4
CHAMA																					
Hg																					
Peso Seco (g)	0,07	0,15	0,12	0,11	0,22	0,17	0,17	0,11	0,08	0,12	0,08	0,17	0,15	0,10	0,20	0,11	0,11	0,16	0,20	0,22	0,13
Volume inicial (ml)	1,6	1,69	1,24	1,55	1,66	1,6	1,6	1,56	1,4	1,4	1,45	1,6	1,57	1,65	1,57	1,45	1,55	1,57	1,52	1,4	1,57
Concentração (mg/l)	0,18	0,19	0,53	0,50	0,61	0,73	0,54	0,54	0,13	0,40	0,46	0,82	0,33	0,45	1,20	0,50	0,27	1,04	0,81	1,39	1,09
Conc. Final (mg/g)	3,98	2,08	5,66	7,25	4,71	6,70	7,51	7,51	2,21	4,79	8,51	7,50	3,36	7,17	9,57	6,51	3,71	10,1	6,11	8,7	12,8
Cu																					
Peso Seco (g)	0,07	0,15	0,12	0,11	0,22	0,17	0,17	0,11	0,08	0,12	0,08	0,17	0,15	0,10	0,20	0,11	0,11	0,16	0,20	0,22	0,13
Volume inicial (ml)	1,6	1,69	1,24	1,55	1,66	1,6	1,6	1,56	1,4	1,4	1,45	1,6	1,57	1,65	1,57	1,45	1,55	1,57	1,52	1,4	1,57
Concentração (mg/l)	0,07	0,14	0,04	0,08	0,28	0,15	0,15	0,10	0,06	0,08	0,08	0,13	0,14	0,12	0,19	0,10	0,10	0,11	0,22	0,15	0,14
Conc. Final (mg/g)	1,59	1,53	0,41	1,17	2,14	1,37	1,45	1,45	1,04	0,97	1,42	1,23	1,43	1,83	1,50	1,28	1,40	1,06	1,64	0,92	1,65
Zn																					
Peso Seco (g)	0,07	0,15	0,12	0,11	0,22	0,17	0,17	0,11	0,08	0,12	0,08	0,17	0,15	0,10	0,20	0,11	0,11	0,16	0,20	0,22	0,13
Volume inicial (ml)	1,6	1,69	1,24	1,55	1,66	1,6	1,6	1,56	1,4	1,4	1,45	1,6	1,57	1,65	1,57	1,45	1,55	1,57	1,52	1,4	1,57
Concentração (mg/l)	0,44	1,01	0,35	0,60	1,36	0,74	0,67	0,67	0,33	0,37	0,40	0,75	0,76	0,70	1,12	0,47	0,47	0,58	1,14	0,74	0,69
Conc. Final (mg/g)	9,61	11,1	3,70	8,70	10,5	6,76	9,32	9,32	5,55	4,41	7,38	6,84	7,74	11,2	8,93	6,13	6,45	5,67	8,56	4,59	8,10
Mn																					
Peso Seco (g)	0,07	0,15	0,12	0,11	0,22	0,17	0,17	0,11	0,08	0,12	0,08	0,17	0,15	0,10	0,20	0,11	0,11	0,16	0,20	0,22	0,13
Volume inicial (ml)	1,6	1,69	1,24	1,55	1,66	1,6	1,6	1,56	1,4	1,4	1,45	1,6	1,57	1,65	1,57	1,45	1,55	1,57	1,52	1,4	1,57
Concentração (mg/l)	0,04	0,09	-	0,06	0,10	0,10	0,10	0,08	-	-	0,05	0,08	0,06	0,07	0,13	0,04	0,05	0,07	0,08	-	0,06
Conc. Final (mg/g)	0,77	1,02	-	0,83	0,80	0,93	1,09	1,09	-	-	0,83	0,74	0,61	1,08	1,01	0,52	0,67	0,69	0,63	-	0,75

$$\text{Concentração Final} = (\text{Concentração} / \text{Peso seco}) \times \text{Volume inicial}$$

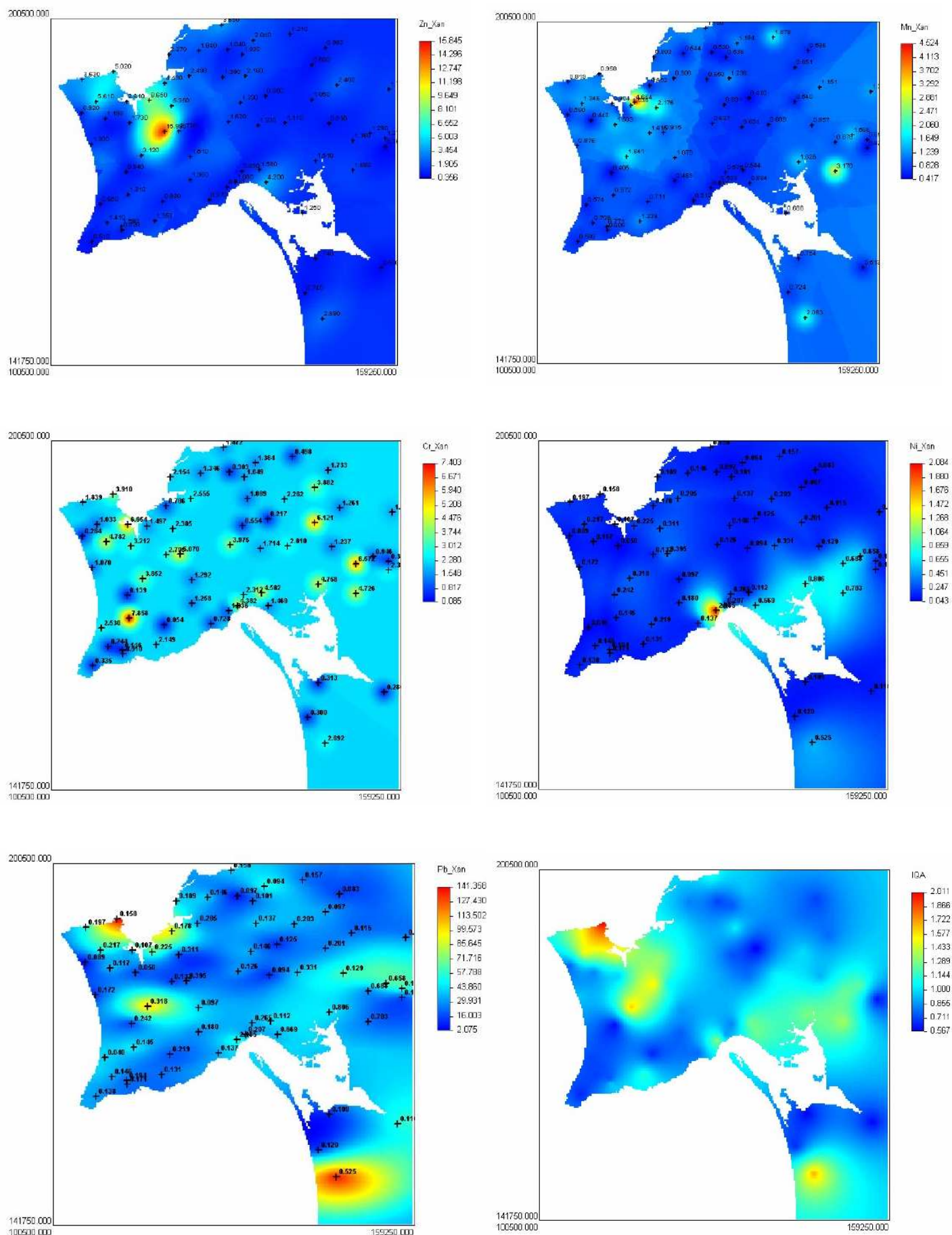


Figura 1. Mapas de concentração de elementos nos líquenes (Zn, Mn, Cr, Ni, Pb, Mapa estimado do índice de deposição multi-elemento) (Augusto 2007).

Protocolo de extracção de DNA de tecido animal através do *Tissue DNA kit (Omega bio-tek)*:

1. Cortar entre 20-30mg de tecido e colocar num tubo de microcentrifuga (1,5ml). Adicionar 200µl de Buffer TL.
2. Adicionar 25µl de OB Protease. Fazer um vortex para misturar bem, e incubar em banho-maria seco com agitação a 56°C para efectuar a lise completa.
3. Centrifugar durante 2 minutos à velocidade máxima (13000 rpm) para formar um *pellet* dos restos de tecido insolúvel.
4. Adicionar 220µl de Buffer BL às amostras e fazer um vortex. Adicionar 220µl de etanol absoluto (96-100%) e fazer vortex novamente.
5. Preparar a coluna adicionando 100µl de Equilibration Buffer inseridas num tubo de 2ml. Centrifugar à máxima velocidade (13000 rpm) durante 20 segundos. Descartar o que fica no tubo de 2ml.
6. Transferir toda a amostra (incluindo algum precipitado que se tenha formado) do passo 5 para a coluna inserida num tubo de 2ml. Centrifugar à velocidade de 12200 rpm durante 30 a 60 segundos e descartar o que fica no tubo de 2ml.
7. Adicionar 500µl de Buffer HB e centrifugar à velocidade de 12200 rpm durante 30 a 60 segundos. Descartar o que fica no tubo de 2ml.
8. Adicionar 700µl de Buffer DNA Wash com álcool absoluto. Centrifugar à velocidade de 12200 rpm durante 30 a 60 segundos.
9. Adicionar 400µl de Buffer DNA Wash à coluna. Centrifugar à velocidade de 13000 rpm durante 2 minutos.
10. Passar a coluna para um novo tubo de 1,5ml e adicionar 100µl de Elution Buffer pré-aquecido a 70°C. Deixar o tubo a 70°C durante 3 minutos.
11. Centrifugar à velocidade de 13000 rpm durante 1 minuto.
12. Passar o *pellet* novamente para a coluna. Deixar o tubo a 70°C durante 3 minutos.
13. Centrifugar à velocidade de 13000 rpm durante 1 minuto.
14. Deitar a coluna para o lixo.

QUADRO 6. Condições de PCR para os genes CYP1A1 e XRCC1

Ingredientes	Concentração Final	Volume/Amostra
Água		5,65µl
Tampão	5x	2,5 µl
dNTPs	10mM	0,5 µl
Magnésio	25mM	1,25 µl
Primer F	25pmol/ µl	0,5 µl
Primer R	25pmol/ µl	0,5 µl
BSA	20mg/µl	1 µl
Taq Polimerase	5U/µl	0,1 µl
DNA	100ng/µl	0,5 µl
TOTAL		12,5 µl

QUADRO 7. Duração, temperaturas e número de ciclos para amplificação dos genes CYP1A1 e XRCC1 no termociclador

Gene CYP1A1			Gene XRCC1		
1 ciclo	95°C	5min	1 ciclo	94°C	10min
	95 °C	30s		94 °C	30s
30 ciclos	60 °C	1min	39 ciclos	58 °C	15s
	72°C	1min		72°C	30s
1 ciclo	72°C	1min	1 ciclo	72°C	5min
	4°C	∞		4°C	∞



Directiva 2004/107/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de Dezembro de 2004, relativa ao arsénio, ao cádmio, ao mercúrio, ao níquel e aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos no ar do ambiente.

QUADRO 8. Valores alvo para o Benzo[a]pireno no ar segundo a Directiva 2004/107/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 15 de Dezembro de 2004

Valores alvo para o arsénio, cádmio, níquel e benzo(a)pireno

Poluente	Valores alvo ⁽¹⁾
Arsénio	6 ng/m ³
Cádmio	5 ng/m ³
Níquel	20 ng/m ³
Benzo(a)pireno	1 ng/m ³

⁽¹⁾ Para o teor total na fracção PM₁₀ calculada como média durante um ano civil.



National Institute of Standards & Technology

Certificate of Analysis

Standard Reference Material 1577b

Bovine Liver

This Standard Reference Material (SRM) is intended primarily for use as a control material and in evaluating analytical methods for the determination of major, minor, and trace elements in animal tissue and other biological matrices.

Certified Values of Constituent Elements: The certified values for the constituent elements are given in Table 1. Certified values are based on results obtained by definitive methods of known accuracy; or alternatively, from results obtained by two or more independent analytical methods. Noncertified values are provided for information only in Table 2. Analytical methods used for the analysis of SRM 1577b, including certified and information values, are given in Table 3.

Notice and Warnings to Users

Expiration of Certification: This certification is invalid after 5 years from the date of purchase and shipment from NIST. Should any of the certified constituents change within a 5-year period purchasers will be notified by NIST.

Stability: The SRM should be kept in its original bottle and stored between 10-30 °C. It should not be exposed to intense sources of radiation. The bottle should be kept tightly closed and stored in a desiccator away from direct sunlight.

Use: A minimum sample of 250 mg of the dried material (see Instructions for Drying) should be used for any analytical determination to be related to the certified values of this Certificate.

Dissolution procedures should be designed to effect complete solution, but without losses of volatile elements, such as mercury. Dissolution for these determinations should be carried out in a closed system.

Statistical consultation was provided by S.B. Schiller of the Statistical Engineering Division.

The overall direction and coordination of the analyses leading to this certification were under the chairmanship of J.R. DeVoe, Chief of the Inorganic Analytical Research Division.

The technical and support aspects involved in the preparation, certification, and issuance of this Standard Reference Material were coordinated through the Standard Reference Materials Program by T.E. Gills.

Gaithersburg, MD 20899
August 27, 1991

William P. Reed, Chief
Standard Reference Materials Program

(over)



Table 1. Certified Values of Constituent Elements

Element		Content (wt. percent)	
Chlorine		0.278 ± 0.006	
Phosphorus		1.10 ± 0.03	
Potassium		0.994 ± 0.002	
Sodium		0.242 ± 0.006	
Sulfur		0.785 ± 0.006	

Element	Content (µg/g)	Element	Content (µg/g)
Cadmium	0.50 ± 0.03	Molybdenum	3.5 ± 0.3
Calcium	116 ± 4	Rubidium	13.7 ± 1.1
Copper	160 ± 8	Selenium	0.73 ± 0.06
Iron	184 ± 15	Silver	0.039 ± 0.007
Lead	0.129 ± 0.004	Strontium	0.136 ± 0.001
Magnesium	601 ± 28	Zinc	127 ± 16
Manganese	10.5 ± 1.7		

The estimated uncertainty of a certified value is the sum of the half-width of a 95% confidence interval for the mean of results and an allowance for systematic error, except for the uncertainty associated with sulfur which is based on scientific judgment and is roughly equivalent to one percent of the certified value. The systematic error is estimated by the maximum absolute deviation between a single method mean and the grand mean. The grand mean was computed using the weighting scheme of Paule and Mandel (NBS Journal of Research 87, pp 377-385).

Table 2. Noncertified Values of Constituent Elements

Element		Content (wt. percent)	
Nitrogen		(10.6)	

Element	Content (µg/g)	Element	Content (µg/g)
Arsenic	(0.05)	Cobalt	(0.25)
Aluminum	(3)	Vanadium	(0.123)
Antimony	(0.003)		
Bromine	(9.7)		
Mercury	(0.003)		

Instructions for Drying: Samples of this SRM must be dried before weighing according to the following procedure: Dry for 24 hours at 20 to 25 °C in a vacuum oven at a pressure not greater than 30 Pa (0.2 mm Hg).

Source and Preparation of Material:

The bovine liver for this standard was obtained in the Portland, Oregon area. The gross fat, major blood vessels, and 'skin' were removed and the liver was ground. The ground liver was then mixed, transferred to polyethylene-lined trays, and lyophilized by Oregon Freeze Dry Foods, Inc., Albany, Oregon. After lyophilization, the liver was powdered in a Tornado mill, packaged in moisture-proof bags, and then transported to the National Institute of Standards and Technology.



Table 3.

Analytical Methods Used for the Analysis of SRM 1577b

<u>Method</u>	<u>Elements Determined</u>
ETAAS	Ag, Cd, As, Co
FES	Ca, Na, Sr
ICP	Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn, Sr
GFAAS	Cu, Mn, Rb, Zn
DCP	P
IC	Cl, S
IDTIMS	K, Pb, Rb, S, Sr
IDSSMS	Cd, Cu, Mo, Se, Zn
INAA	Cl, Cu, Fe, Mn, Na, Rb, Se, Zn, Al, Br, Co, K, V, Mg, Ag
RNAA	Ag, As, Cd, Cu, Hg, Mo, Se, Sb
POL	Fe
Color	P
Kjeldahl	N
CVAAS	Hg
FAAS	Ca, Mg

ETAAS: Electrothermal atomic absorption spectrometry

FES: Flame atomic emission spectrometry

ICP: Inductively coupled plasma emission spectrometry

GFAAS: Graphite furnace atomic absorption spectrometry

DCP: Direct current plasma emission spectrometry

IC: Ion chromatography

IDTIMS: Isotope dilution thermal ionization mass spectrometry

IDSSMS: Isotope dilution spark source mass spectrometry

INAA: Instrumental neutron activation analysis

RNAA: Radiochemical neutron activation analysis

POL: Polarography

Color: Spectrophotometry

Kjeldahl: Titrimetry

CVAAS: Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry

FAAS: Flame Atomic Absorption Spectrometry

AnalystsAnalytical Chemistry Division, National Institute of Standards & Technology:

- | | |
|--------------------|-----------------------|
| 1. J.V. Bailey | 15. H.M. Kingston |
| 2. I.L. Barnes | 16. W.F. Koch |
| 3. E.S. Beary | 17. G.M. Lambert |
| 4. C.G. Blandell | 18. R.M. Lindstrom |
| 5. K.A. Brletic | 19. G.J. Lutz |
| 6. T.A. Butler | 20. L.A. Machlan |
| 7. E.R. Deardorff | 21. E.J. Maienthal |
| 8. M.S. Epstein | 22. T.J. Murphy |
| 9. J.W. Gramlich | 23. P.J. Paulsen |
| 10. R.R. Greenberg | 24. L.J. Powell |
| 11. S. Hanamura | 25. T.C. Rains |
| 12. S.H. Harrison | 26. T.A. Rush |
| 13. E.F. Heald | 27. R.L. Walters, Jr. |
| 14. W.R. Kelly | 28. R. Zeisler |

Cooperating Analysts:

30. M. Gallorini and E. Orvini, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Centro di Radiochimica e Analisi per Attivazione presso l' Istituto di Chimica Generale dell'Universita, Pavia, Italy.

31. L. Kosta, A.R. Byrne, M. Dermelj, Institute "Josef Stefan", Ljubljana, Yugoslavia.

+

